

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-506432

第6部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)7月13日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
G 0 1 N 27/447			
C 0 7 H 21/04	Z	8615-4C	
C 0 7 K 1/26		8318-4H	
		7363-2J	G 0 1 N 27/ 26
		7363-2J	3 3 1 Z
			3 0 1 A
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-519538  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)4月30日  
 (85) 翻訳文提出日 平成6年(1994)10月27日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US93/04078  
 (87) 国際公開番号 WO93/22665  
 (87) 国際公開日 平成5年(1993)11月11日  
 (31) 優先権主張番号 877, 956  
 (32) 優先日 1992年5月1日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), JP, US

(71) 出願人 アブライド バイオシステムズ, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
 94404 フォスター シティ, リンカーン  
 センター ドライブ 850  
 (72) 発明者 デモレスト, デイビッド エム  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
 95066 スコッツ バレイ, ナシュア ド  
 ライブ 17エイ  
 (74) 代理人 弁理士 舟橋 榮子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリマー含有溶液を使用する生体分子のキャピラリー電気泳動分子量分離

## (57) 【要約】

キャピラリー電気泳動および方法において使用するために荷電した内側表面をもつキャピラリーチューブ。このチューブは (A) 20~5,000 キロダルトンの分子量、および (B) 全ポリマーサブユニットに対し荷電したモノマーサブユニットのモルパーセントによって測定される 0.01 および 1.0 % の間の電荷によって特徴づけられる 0.05~80 % 重量/重量の親水性ポリマーを含有する電解質溶液で充填され、前記荷電したモノマーサブユニットは選択された電気泳動 pH にて壁電荷と逆の電荷を有する。

## 請求の範囲

1. 2つの端部をもつキャピラリーチューブを用意し、このキャピラリーチューブは(i) その内壁表面に荷電した化学基を有し、そして(ii) (a) 分子量が20と5,000キログルトンの間、および(b) 全ポリマーサブユニットに対し荷電したモノマーサブユニットのモルパーセントによって測定されるとき0.01ないし1.0%の間の電荷パーセント、を有する少なくとも1つのポリマーまたはコポリマー種を含有する非架橋親水性ポリマーまたはコポリマー溶液の重量(w/w)に対し0.05ないし30重量%を含有する電解質溶液を充填し、前記荷電したモノマーサブユニットは選択された電気泳動のpHで壁電荷と逆の電荷を有し、チューブの端部は電解質溶液を含有するアノードとカソードの貯蔵器に浸し、分離される生体分子を含有する試料をチューブの1端に導入し、試料中の前記生体分子を分離するために有効な極性を用いて貯蔵器を横切って電界を印加する各工程から成る試料中の生体分子を分離する方法。

2. ポリマーまたはコポリマーは、ポリアクリルアミド類、ポリオキシド類、ポリエーテル類、ビニルポリマー類、セルロースポリマー類、アクリルポリマー類、および天然ゴム類および多糖類から成る群から選ばれ、前記ポリマーまたはコポリマーは特定の電荷パーセントを含むように改変されている、請求項1の方法。

3. ポリマーまたはコポリマーは、ポリアクリルアミド、ポリ(メタクリルアミド)、ポリ(N-メチルアクリルアミド)、およびポリ(N, N-ジメチルアクリルアミド)から成る群から選ばれるポリアクリルアミド類である、請求項2の方法。

4. ポリマーまたはコポリマーは、ポリエチレンオキシドおよびポリプロピレンオキシドから成る群から選ばれるポリオキシド類である、請求項2の方法。

5. ポリマーまたはコポリマーは、ポリエーテル類であり、このポリエーテルがポリビニルメチルエーテルである、請求項2の方法。

法。

14. ポリマーが、アクリルアミドとテトラメチルエチレンジアミン(TBEMED)のコポリマーであり、前記コポリマーが約100と500キログルトンの間の分子量を有し、そしてポリマー分子がアクリルアミドサブユニットにつき0.05ないし0.5%の第3アミンテトラメチルエチレンジアミンを含有する、請求項1の方法。

15. ポリマーが、N, N-ジメチルアクリルアミドとテトラメチルエチレンジアミン(TBEMED)のコポリマーであり、前記コポリマーが約200と800キログルトンの間の分子量を有し、そしてポリマー分子がN, N-ジメチルアクリルアミドサブユニットにつき0.03ないし0.6%の第3アミンテトラメチルエチレンジアミンを含有する、請求項1の方法。

16. ポリマーが、アクリルアミドと(3-(メタクリロイルアミノ)プロピル)トリメチルアンモニウムクロリドのコポリマーであり、前記コポリマーが約200と600キログルトンの間の分子量を有し、そしてポリマー分子がアクリルアミドサブユニットにつき0.01ないし0.2%の第4アミンN-(プロピル)トリメチルアンモニウムクロリドメタクリルアミドを含有する、請求項1の方法。

17. 壁電荷と逆の電荷を含有するポリマー分子の濃度が、非共有的に壁表面を被覆し、約 $2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{秒} \cdot \text{V}$ 以下に電気浸透流を制御し減少させるために十分である、請求項1の方法。

18. さらにチューブ中の生体分子の電気化学的、光学的またはラジオアイソトープによる性質を測定して電気泳動キャピラリーチューブ中の分離された生体分子の存在を検出することを含む、請求項1の方法。

19. 前記生体分子がタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドから成る群から選ばれる、請求項1の方法。

20. 前記生体分子がドデシル硫酸ナトリウムで変性されており、ドデシル硫酸ナトリウムは電解質溶液中に存在する、請求項19の方法。

21. 前記生体分子が核酸フラグメントである、請求項1の方法。

6. ポリマーまたはコポリマーは、ポリビニルピロリジン、ポリビニルアルコール、およびポリビニルアセテートから成る群から選ばれるビニルポリマー類である、請求項2の方法。

7. ポリマーまたはコポリマーは、キサンタン類、デキストラン類、寒天、ガール、および糊粉類から成る群から選ばれる天然ゴム類および多糖類である、請求項2の方法。

8. ポリマーまたはコポリマーは、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、およびヒドロキシプロピルメチルセルロースから成る群から選ばれるセルロースポリマー類である、請求項2の方法。

9. ポリマーまたはコポリマーは、ポリヒドロキシエチルメタクリレートおよびポリエチレングリコールモノメタクリレートから成る群から選ばれるアクリルポリマーである、請求項2の方法。

10. ポリマーまたはコポリマー溶液がホモポリマーを含有する、請求項1の方法。

11. ポリマーまたはコポリマー分子は、第1アミン類、第2アミン類、第4アミン類、カルボン酸類、スルホン酸類、リン酸類、硫酸類、およびホスホン酸類から成る群から選ばれる少なくとも1個の荷電した基を含む、請求項1の方法。

12. ポリマーまたはコポリマー分子は、ジアルジメチルアンモニウム塩、テトラメチルエチレンジアミド、(3-(メタクリロイルアミノ)プロピル)トリメチルアンモニウム塩、2, 2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)塩、および2-メチルアクリルオキシエチル(トリメチルアンモニウム)塩から成る群から選ばれる化合物から誘導される正に荷電した基を含む、請求項1の方法。

13. ポリマーが、アクリルアミドとジアルジメチルアンモニウムクロリド(DADMAC)のコポリマーであり、前記コポリマーが約200と600kdの間の分子量を有し、そしてポリマー分子がアクリルアミドサブユニットにつき0.02ないし0.4%の第4アミンN, N-ジメチルピロリジンを含有する、請求項1の方法。

22. 核酸フラグメントが尿素またはホルムアミドで変性され、尿素またはホルムアミドは電解質溶液中に存在する、請求項21の方法。

23. フラグメントが2本鎖核酸であり、そして前記示差移動度がフラグメントに内位添加剤を添加して調整され、ポリマー溶液を介してさらに小さい分子量のフラグメントの移動速度を選択的に増加する、請求項21の方法。

24. DNA試料の制限消化分析を行う際に使用するため、さらに1またはそれ以上の選択された制限エンドヌクレアーゼで試料を消化することから成る、請求項21の方法。

25. 核酸フラグメントがDNA配列反応の生成物であり、DNA配列反応が蛍光標識で標識を付けた核酸を含む、請求項21の方法。

26. 生体分子が1本鎖DNAであり、生体分子の相対移動が生体分子間の配座多形性に依存する、請求項21の方法。

27. 前記生体分子がポリメラーゼ鎖反応の増殖生成物であるDNA分子である、請求項21の方法。

28. 前記生体分子が核酸-タンパク質複合体である、請求項1の方法。

29. 前記生体分子が、線状、分枝状、天然および化学的改変オリゴ糖類から成る群から選ばれる、請求項1の方法。

30. その内壁表面に荷電した化学基を有し、(a) 分子量が20と5,000キログルトンの間、および(b) 全ポリマーサブユニットに対し荷電したモノマーサブユニットのモルパーセントによって測定されるとき0.01ないし1.0%の間の電荷パーセント、を有する少なくとも1つのポリマーまたはコポリマー種を含有する非架橋親水性ポリマーまたはコポリマー溶液の重量(w/w)に対し0.05ないし30重量%を含有する電解質溶液を充填したキャピラリーチューブから成り、前記荷電したモノマーサブユニットが、選択された電気泳動pHにて壁電荷と逆の電荷を有する、キャピラリー電気泳動に使用するための充填キャピラリーチューブ。

31. ポリマーまたはコポリマーは、ポリアクリルアミド類、ポリオキシド類、

ポリエーテル類、ビニルポリマー類、セルロースポリマー類、アクリルポリマー類、および天然ゴム類および多糖類から成る群から選ばれ、前記ポリマーまたはコポリマーは特定の電荷パーセントを含むように改変されている、請求項30のチューブ。

32. ポリマーまたはコポリマー分子は、第1アミン類、第2アミン類、第4アミン類、カルボン酸類、スルホン酸類、リン酸類、硝酸類、およびホスホン酸類から成る群から選ばれる荷電した基を有する荷電した基を含む、請求項30のチューブ。

# ポリマー含有溶液を使用する生体分子のキャピラリー電気泳動分子重量分離

## 発明の技術分野

本発明は生体分子（例えばポリペプチド類、核酸類、およびオリゴ糖類）の分離、特に、分子篩マトリックスおよびキャピラリー電気泳動のための非共役壁コーティングの両方として有効である約0.01および1.0%の間の電荷パーセントを有する親水性ポリマーを含有する低粘度溶液の使用に関する。

## 参考文献

- アルスチン、ジェイ・エム・ヴィら、米国特許第4,690,749号、発行9/1/87。  
 アウスベル、エフ・エムら、*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., Media PA.  
 ボード、エイチ・ジェイ、*Physiol. Chem.* Bd. 359S: 1237-1238 (1978).  
 ボヒンスキ、アール・シー、*Modern Concepts in Biochemistry*, 2版、Allen and Bacon, Inc.  
 カンター、シイ・アールら、PCT国際出願 83/US1826 111883, WO A1 840524 (1984).  
 カンター、シイ・アールら、*Biochem.* 27: 9216-9221 (1988).  
 コーエン、エイ・エスら、*Anal. Chem.* 59: 1021 (1987).  
 コーエン、エイ・エスら、*J. Chromatography*, 458: 323 (1988).  
 コーエン、エイら、米国特許第4,997,537号、発行3/5/91.  
 コンプトン、エス・ダブリュら、*Biotechniques*, 6(5): 432 (1988).  
 フロッセマン、エイチら、*Anal. Chem.*, 62: 900 (1990).  
 ジェン、ユン、カナダ特許第579(222)号、発行1959年7月7日。  
 カーガー、ビー・エルら、ヨーロッパ特許第EP417925号、発行3/20/91.  
 カスパー、ティ・ジェイら、*J. Chromatography*, 458: 303 (1988).  
 クリッケー、ダブリュ・エムら、*Prog. Polym. Sci.* 8: 373 (1982).  
 マキノ、アールら、*PCR Methods and Applications* 2(1): 10 (1992).  
 マニアチス、ティラ、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, コールド・スプリング、ハーバー・ラボラトリー (1982).

マシュウ、エム・ケイら、*Biochem.* 27: 9222-9226 (1988).  
 マシュウ、エム・ケイら、*Biochem.* 27: 9204-9210 (1988).  
 マシュウ、エム・ケイら、*Biochem.* 27: 9210-9216 (1988).  
 マックコーミック、シイ・エルら、*J. Macromol. Sci., Chem.* A16(8): 1441-1462 (1981).

ムリス、ケイ・ビー、米国特許第4,683,202号、発行1987年7月28日。  
 ムリス、ケイ・ビーら、米国特許第4,683,195号、発行1987年7月28日。  
 オガワ、エム、米国特許第4,657,656号、発行4/14/87。  
 オガワ、エムら、米国特許第4,963,243号、発行10/16/90。  
 タカギ、ティラ、*Electrophoresis*, 12: 436-438 (1991).  
 ウィクトロウィッツ、米特許第5,015,350号。  
 ウィドハルム、エイラ、*Chromatographs* 549: 446-451 (1991).  
 ゴー、ディーゼットら、米国特許第5,069,766号、発行1991年12月3日。

## 発明の背景

電気泳動はDNA種、タンパク質、ペプチド、および誘導化アミノ酸を含む種々の生体分子の分離に広く使用される。高速高分解分離ができる1つの電気泳動技術はキャピラリー電気泳動（CE）である（コーエン、1987、1988；コンプトン；カスパー）。一般的には、CEは内径が約10-200ミクロンで、長さが約5-100cmまたはそれ以上の範囲にある融解シリカキャピラリーチューブを用いる。

通常の電気泳動方法では、電気泳動チューブ、またはスラブは流動性電気泳動媒体で充填され、流動性媒体は非流動性安定化ゲル分離媒体を形成するように共有架橋または温度固化される。試料容量はチューブの一端に引き入れまたは添加され、電界は媒体を介して試料を引き出すようにチューブを横切って配置される。マトリックス内の電気泳動分離は、変性タンパク質および核酸種（これらは電荷密度がほぼ同じである）の場合には分子の大きさに、或いはペプチドおよびタンパク質の場合には、大きさと電荷の組合せに基づかせることができる。

分離媒体のポリマー濃度および/または架橋度を覚えて広範囲の分子重量および電荷の種の分離を行うことができる。約1,000塩基よりも大きい核酸フラグメントを分離するため、例えば、好ましい温度固化物質はアガロースであり、アガロ

ースの濃度は、5-60キロ塩基の大きさの範囲でフラグメントを分離するため、約0.3%から、100-3,000塩基対の範囲でフラグメントを分離するため、約2%まで変えることができる（マニアチス）。さらに小さいフラグメント、一般的には約1,000塩基対以下では、通常架橋したポリアクリルアミドで分離される。アクリルアミドポリマーの濃度は、100-1,000塩基対の範囲でフラグメントを分離するために、約3.5%から、10-100塩基対の大きさの範囲で分離するために、約20%までの範囲であることができる。タンパク質を分離するため、約3%~20パーセントの間の濃度で架橋したポリアクリルアミドが一般に適当である。一般に、分離される分子種が小さい程、架橋ポリマーの濃度は高い。

上述のタイプの固化電気泳動媒体において得られる分解能は限られており、小さい分子重量の場合には、電気泳動チューブ内、および特にキャピラリーチューブ内で、高ポリマー濃度にて均質で均一なポリマーマトリックスを形成することが難しい。チューブ内に高濃度の固化マトリックスを形成するための通常の方法では、高濃度のモノマー溶液（アクリルアミドおよびビスアクリルアミド）は、流動性の形態で液体がチューブ内に導かれる。流動性物質を次に、例えば、過硫酸塩の存在で光を照射して重合化させる。

高いポリマー濃度にて、チューブ内に形成された反応熱勾配は、マトリックスの不均質に導くことができる不均一な反応速度および熱乱流を生成する傾向がある。また、架橋反応中に生成した閉じ込められたガスの気泡はマトリックス中に空隙を生成する。マトリックス中の非均一性は、特に、密接に関連した小さい分子重量の種の中で達成できる分解能の度合を制限する。

あるいはまた、温度固化ポリマーの場合には、ポリマーが流動性形態で電気泳動チューブに導かれ、次に冷却によってゲルを固体の形態にすることができる。このアプローチは、しかしながら、粘性質を設定する必要な温度固化硬化性を有することが知られている寒天やアガロースのようなポリマーは、高ポリマー濃度でも、低分子重量の種を分離するために有効ではないので、小さいペプチドやオリゴヌクレオチドのような、低分子重量の種を分離するためには一般に適さない。

架橋または温度固化マトリックスと関連する第2の制限は、電気泳動分離後、マトリックス内の分離した分子種を回収することが困難なことである。標準スケ

ールの電気泳動チューブの場合では、固化したマトリックスはマトリックスを除くことができる前にチューブ壁から注意して分離する必要があり、この方法は直径が小さいチューブでは事実上不可能である。マトリックスが除去され、所望の分子種を含有するマトリックス領域が同定された後でも、関係のある種を長い溶出手順によって、あるいは電気泳動溶出によってのみマトリックス領域から回収することができる。

C Bでは、コーティング物質は一般的にマイクロキャピラリーチューブ壁に共有結合していた(コーエンら、1991; カーガーら、1989; アルステンら、1987)。最も普通で重合したマトリックスはコーティング物質を共有結合した後に導かれる(コーエンら、1991; カーガーら、1989)。水溶性ポリマーは架橋重合電気泳動媒体に脆弱性を減らすため、すなわち取扱容易性を改善するため、そして移動速度特性を改善するために添加された(オガワ、1987; オガワら、1990)。

グロスマン(米国特許第5,126,021号、1992年6月30日発行)は、生体ポリマーのキャピラリー電気泳動分離のために有用なメッシュ寸法を有する低粘度溶液中に荷電していない水溶性ポリマーを使用することを記載している。

ウィクトロウィッツ(米国特許第5,015,350号)は生体ポリマーの分離のために電気浸透流を調整するため非共有コーティングを使用することを記載している。キャピラリーチューブはアノードとカソードの電解質貯蔵器との間に連結し、電界を貯蔵器を横切って配置し、チューブ内に電気浸透流を生成させる。電気浸透流の間に、チューブの表面電荷を変えることができる化合物をチューブ内に引き入れチューブに通し、チューブ内の電気浸透流の割合をモニターする。前記モニタリングから測定されるように、チューブ内の所望の電気浸透流の割合が得られるまで、化合物をチューブ内に引き入れチューブに通すことを続ける。

ゾーラ(米国特許第5,059,766号)は1または両方の電極室溶液に粘度上昇添加物を含有させてキャピラリー電気泳動中に電気浸透流を抑えることを記載している。

タンパク質の大きさによる分離は、液体ポリアクリルアミドを用いて行われた(ウイダルムら、1991; タカギら、1991; ボード、1978)。しかしながら、C Bにおいて液体ポリアクリルアミドを用いるタンパク質分離は(i)タンパク質

ポリマーまたはコポリマー溶液はホモポリマー、コポリマー、またはこれら2種の混合物を含むことができる。

本発明の実施に用いられるポリマーまたはコポリマー分子は少なくとも1つの荷電した基を含み、これは第1アミン、第2アミン、第4アミン、カルボン酸、スルホン酸、リン酸、硫酸、およびホスホン酸から成る群から選ばれる電荷を有する。ポリマーまたはコポリマー分子は、第1アミン、第2アミン、および第4アミンから成る群から選ばれる少なくとも1つの荷電した基、およびカルボン酸、スルホン酸、リン酸、硫酸、およびホスホン酸から成る群から選ばれる少なくとも1個の荷電した基を含むことができる。

本発明の1の具体例では、ポリマーはアクリルアミドおよびジアリルジメチルアンモニウムクロリド(DADMAC)のコポリマーであり、このコポリマーは分子量が約200と600kdの間にある。さらに、ポリマー分子は1サブユニットのアクリルアミドにつき0.02ないし0.4%の第4アミンN,N-ジメチルピロリジンを含む。

本発明の他の具体例では、ポリマーはアクリルアミドとテトラメチルエチレンジアミン(TMEMD)のコポリマーであり、このコポリマーは約100と500キロダルトンの間の分子量を有する。さらに、ポリマー分子は1サブユニットのアクリルアミドにつき0.05ないし0.5%の第3アミンテトラメチルエチレンジアミンを含有する。

他の具体例では、壁電荷と逆の電荷を含むポリマー分子の濃度は壁表面を非共有的に被覆し、約 $2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{秒}$ ・V以下に電気浸透流(EOP)を有意にコントロールし減らすために十分である。

さらに本発明の方法はチューブ中の生体分子の電気化学的、光学的(例えばUV吸収または蛍光)またはラジオアイソトープによる性質を測定することによって電気泳動キャピラリーチューブ中の分離した生体分子の存在を検出することを含むことができる。

本方法はタンパク質類、ポリペプチド類、およびペプチド類の分離に応用することができる。これらの生体分子は電気泳動媒体のpHで正味の正または負の電荷を有することができる。1つの具体例では、生体分子は、例えば、ドデシル硫

またはタンパク質複合体の移動の電気浸透流の効果(ウイダルムら、1991)。

(ii) 試料のタンパク質またはタンパク質複合体を別々のバンドに分離するために十分に高いポリアクリルアミド濃度の使用(タカギら、1991)、および(iii)タンパク質バンドの追跡(ボード、1978)を含む付随する問題がある。

#### 発明の概要

本発明は試料中の生体分子を分離する方法を提供する。2つの端部をもつキャピラリーチューブを用意する。このキャピラリーチューブは

(i) その内壁表面に荷電した化学基を有し、そして

(ii) (a) 分子量が20および5,000キロダルトンの間、および(b) 0.01ないし1.0%の間の電荷パーセントを有する少なくとも1つのポリマーまたはコポリマー種を含有する非架橋親水性ポリマーまたはコポリマー溶液の重量(w/w)に対し0.05ないし30重量%を含有する電解質溶液を充填する。電荷パーセントは全ポリマーサブユニットに対し荷電したモノマーサブユニットのモルパーセントによって測定され、そこでは荷電したモノマーサブユニットは選択された電気泳動のpHで壁電荷と逆の電荷を有する。チューブ端は電解質溶液を含有するアノードとカソードの貯蔵器に浸す。分離される生体分子を含有する試料は、チューブの1端に導入される。次に試料中の前記生体分子を分離するために有効な極性を用いて貯蔵器を横切って電界を印加する。

本発明に有用なポリマーまたはコポリマーは次の群を含む: ポリアクリルアミド類(例えば、ポリアクリルアミド、ポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)およびポリメタクリルアミド)、ポリオキシド類(例えば、ポリエチレンオキシドおよびポリプロピレンオキシド)、ポリエーテル類(例えば、ポリビニルメチルエーテル)、ビニルポリマー類(例えば、ポリビニルピロリジン、ポリビニルアルコール、およびポリビニルアセテート)、セルロースポリマー類(例えば、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、およびヒドロキシプロピルメチルセルロース)、アクリルポリマー類(例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリレートおよびポリエチレングリコールモノメタクリレート)、天然ゴムおよび多糖類(例えば、キサンタン類、デキストラン類、寒天、ガール、および澱粉類)。

酸ナトリウムを用いて分離の前に変性させることができる。変性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウムは、また電解質溶液に存在させることもできる。

さらに、本方法は核酸フラグメントの分離に応用することができる。核酸フラグメントは1本鎖または2本鎖のDNAまたはRNAであることができる。2本鎖核酸の示差移動度はフラグメントに内位添加剤を添加して調整され、ポリマー溶液を介して一層小さい分子量のフラグメントの移動速度を優先的に増加させることができる。このような内位添加剤の例としては臭化エチジウムおよびアクリジンオレンジがある。本発明の方法は、一試料を1またはそれ以上の選ばれた制限エンドヌクレアーゼを用いて処理した後、DNA試料の制限消化分析を行うために応用することができる。

本発明の方法はまた線状、分枝状、天然および化学的に改変されたオリゴ糖類の分離に応用することもできる。

本発明はさらに本発明の方法に使用するため充填されたキャピラリーチューブから成る。このキャピラリーチューブはその内壁表面に荷電した化学基を有し、

(a) 20と5,000キロダルトンの間の分子量、および(b) 0.01ないし1.0%の間の電荷パーセントを有する少なくとも1のポリマーまたはコポリマー種を含有する非架橋、親水性ポリマーまたはコポリマー溶液の重量(w/w)に対し0.05ないし30重量%を含有する電解質溶液で充填されている。上記のように、電荷パーセントは全ポリマーサブユニットに対し荷電したモノマーサブユニットのモルパーセントによって測定され、そこでは荷電したモノマーサブユニットは選択された電気泳動pHにて壁電荷に対し逆の電荷を有する。

上記のポリマーおよび荷電した基はキャピラリーチューブを充填するために使用することができる。

#### 図面の簡単な説明

図1は本発明の方法を実施する際に使用されるキャピラリー電気泳動システムの概略図である。

図2はパルス電圧と一定電圧のモードを同時に操作するために設計されたキャピラリー電気泳動システムの概略図であり;

図3はキャピラリー電気泳動チューブの拡大断片図であり、右から左への方向

に電気浸透流 (e) を示している。

図4は重合化反応でTBMED濃度を増加させることによる2% (w/v) ポリアクリルアミドの粘度とEOFの効果を示す。

図5は重合化反応でDADMAC濃度を増加させることによる2% (w/v) ポリアクリルアミドの粘度とEOFの効果を示す。

図6は多成分を有するタンパク質混合物の別々のピークへの分離を示す。分離に使用したコポリマーDADMAC/(AA)<sub>2</sub>は各電気泳動図の右側に示す。

図7は上述したタンパク質混合物の別々のピークへの分離を示す。分離のために使用したコポリマーDADMAC/(AA)<sub>2</sub>は各電気泳動図の右側に示す。

図8はアクリルアミドとDADMACサブユニットから作成された線状コポリマーについて提案された構造を示す。

図9はパルス幅と最大電圧V<sub>max</sub>を有する印加した矩形波電圧に関して、比較的小さい核酸フラグメント (点線) と比較的大きな核酸フラグメント (一点鎖線) に対する仮定的な速度曲線を示す。

図10は最も早い移動成分に関してタンパク質混合物の成分のための校正曲線の結果を示す。プロットはタンパク質成分の相対移動度に対する対数 (分子量) を示す。

図11は本発明のポリマー溶液を用いるタンパク質分離の50連続行程から標本を取った3行程の結果を示し、そこではキャピラリーチューブはポリマー溶液を用いてだけ行程間にフラッシュさせた。

図12は1、2、および3% (w/v) の本発明のカチオンコポリマー中の2本鎖DNA分子の分離を示す。

図13はポリアクリルアミド分子量標準の対数に対する対数比粘度のプロットを示す。

図14は単一分子量のポリアクリルアミド (367kd) のパーセント濃度に対する対数比粘度のプロットを示す。

図15は一番早い移動成分に関して、ポリアクリルアミド%値の範囲を超えるポリアクリルアミド%に対するタンパク質混合物中のタンパク質の相対移動時間のプロットを示す (ファーンソン回帰分析)。

本発明は生体分子の分離に使用するための電解質溶液中の少なくとも1のポリマーまたはコポリマーの使用を記載する。本発明の電解質溶液を含有するポリマー (ポリマー溶液) は一般にキャピラリーチューブに導入され、そこではキャピラリーチューブはその内壁表面に荷電した化学基を有する。内表面壁の負に荷電した基をもつキャピラリーの具体例はガラスまたは溶融シリカである。次にキャピラリーチューブは非架橋の親水性ポリマーまたはコポリマーの重畳 (w/w) に対し0.05ないし30重量%を含有するポリマー溶液で充填される。溶液は1またはそれ以上のポリマーまたはコポリマー種を含むことができる。一般に、ポリマーまたはコポリマー種は (i) 分子量が20と5,000 キログラムの間であり、そして (ii) 電荷パーセントが0.01と1.0%の間である。選択された電気泳動のpHでは、ポリマーまたはコポリマーの電荷はキャピラリーチューブの内壁表面上の荷電した化学基とは逆である。

キャピラリーチューブの末端は電解質溶液を含有する上記ポリマーを含むアノードまたはカソードの貯蔵器に浸漬される。生体分子または生体分子混合物の試料はキャピラリーチューブの1端に導かれ、貯蔵器を横切って電界を印加する。荷電した生体分子は電界を通過して移動するので、それらはポリマー溶液によって確立された適分けマトリクスを通過して示差移動によって寸法および/または形状に基づいて分離される。

#### 1. 電気泳動システム

図1は本発明方法を実施するために適しているキャピラリー電気泳動システム20 (アブライド・バイオシステムズ、フォスターシティ CA) の簡単な概略図である。このシステムは好ましくは約10~200cm、一般には約100cm以下の長さ、および好ましくは約10~200cm、一般には約100cm以下の長さ、および好ましくは約10~200μm (ミクロン)、一般には約50μmの内径を有するキャピラリーチューブ22を含む。図に示した例では、チューブを水平位置に支持し下方に曲げられた末端領域をもつ。ひとつの好ましいキャピラリーチューブは50μmの内径をもつ溶融シリカチューブであり、ポリマイクロ・テクノロジーズ (フェニックス AZ) から入手できる。

さらに一般に、キャピラリーチューブは、好ましくは200μmまたはそれ以下

#### 用語の定義

本発明におけるポリマーの語は特徴的な型: すなわち、同一のサブユニットから成るホモポリマー、において一緒に共有結合したさらに小さいモノマーサブユニットから成る大きい分子をその伝統的な意味で用いる。コポリマーの語は同一分子中に2種またはそれ以上の種類のモノマー単位を含むポリマーに適用するために用いられる。共重合によっていずれかのホモポリマーの性質とは異なる性質をもつコポリマー物質を作ることができる。本発明におけるコポリマーの例は図8に示される提案された構造を有する線状ポリマーを形成するためのアクリルアミドとDADMACの混合物である。明細書中では、ポリマー溶液はポリマー、ポリマーの混合物、コポリマー、コポリマーの混合物、またはポリマーとコポリマーの混合物を含んだ溶液に適用される。

親水性の語は水または水緩衝液系に溶解できるポリマー/コポリマーを記述する。

本発明の文脈において、生体分子の語は一般にタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸、一本鎖および二本鎖DNAおよび/またはRNAに関連する。オリゴ糖類または糖タンパク質のような他の生体分子もまた本発明の方法によって分析することができる。生体分子は線状、分枝状、天然または化学的に改変することができる。

タンパク質は一般にポリマーを基礎としたアミノ酸の長鎖である (ポリペプチド)。タンパク質は1、2またはそれ以上のポリペプチド鎖から成り、さらに例えば鉄または炭水化物のようなポリペプチド鎖と会合する若干の他の型の物質を含むことができる。タンパク質の大きさは (任意の数の) 5,000ないし数10万ダラム/モルのむしろ広い範囲をカバーする。5,000の数字は約40~45のアミノ酸の存在に相当する。約5,000g/モルよりも小さいタンパク質は一般にポリペプチドまたは単にペプチドと呼ばれる (ポンスキー)。

電解質溶液中のポリマーおよび/またはコポリマーに対する電荷パーセントは全ポリマーサブユニットに関して荷電したモノマーサブユニットのモルパーセントとして測定される。

発明の詳細な説明

のカラム内部または直径の厚さにて、ポリマー溶液のカラムを支持することができるチューブまたは導管のいずれかであることができる。例えば、チューブはガラススライド等に形成された導管の形にすることができる。

一般にキャピラリーチューブの内側表面はその内壁表面に荷電した化学基を有する。本発明の1の具体例では、チューブの内側表面に好ましくは約4~9の間のpHにて負に荷電した化学基をもつ。表面の化学基は表面が負に荷電したシリノール基を有する溶融シリカチューブに対する場合のように、キャピラリー物質の固有の性質であることができる。あるいは、または加えて、キャピラリー壁は内側のキャピラリー壁に、酸基のような負の化学基を共有結合するための既知の誘導化試薬、または既知の負に荷電した表面被覆剤を用いて処理することができる。あるいは、内壁表面に共有結合した正に荷電した基をもつように内壁表面を電子対を共有するように改変することができる。ガラス等を誘導または被覆するための方法は当該分野では良く知られている。1の好ましいキャピラリーチューブは内径が50μmの溶融シリカチューブであり、ポリマイクロ・テクノロジーズ (フェニックス AZ) から入手できる。

以下に示した極性は分離される生体分子に依存して切り換えることができる: 検出器の側の貯蔵器および試料の側の貯蔵器ーカソードからアノードまでまたはアノードからカソードまで。工程の極性は、各貯蔵器の電荷に関連して、多くのキャピラリー電気泳動機械につき選択することができる。

システム内のカソードの貯蔵器26は電解質ポリマー溶液28を含む: このポリマー溶液は以下に記載される。22aで示されたチューブのカソード端部を、図に示すように、電気泳動の間、ポリマー溶液に浸す。

システム内の試料チューブ30は、チューブのカソード末端に装填される生体分子の混合物を含む。好ましくは試料物質は希釈電解液または水に溶解する。試料とカソードの貯蔵器は、チューブのカソード下端を貯蔵液に浸すことができる位置に配置するために、カルーセル等に支持することができる。図には示していないが、カルーセルは、例えば、電気泳動の工程または異なるポリマー溶液の間でチューブを洗浄またはフラッシュするための溶液を含む追加の貯蔵器を備えることができる。

22bで示される、チューブの反対のアノード端部は、アノード貯蔵器32内にシールされており、図に示すように、貯蔵器に含まれる電解液34を含有するアノードポリマー膜す。貯蔵器内の第二のチューブ38は、例えば、洗浄液、電気泳動ポリマー溶液のような液体をチューブを介して引き出し、貯蔵器30の生体分子試料物質をチューブに塗着するために、微細に調整された真空装置（図には示していない）に連結する。真空装置に代わるものとして、正圧システムを使用して洗浄液、試料等を通くことができる。

システムの高圧電源40は、2つの貯蔵器間に選択された電位を印加するため、図に示すようにカソードとアノードの貯蔵器に連結する。電力供給導線を、それぞれ、カソード貯蔵器とアノード貯蔵器の白金電極41、42に連結する。電源は電極を通る定電圧(DC)を、好ましくは5〜50kVに設定した電圧で、印加するように設計することができる。また代わりに、あるいは加えて、電源を貯蔵器間に選択された周波数のパルス電圧を印加するように設計することができる。一般にキャピラリーチューブが短いほど、印加できる電界強度が高くなり、電気泳動分離が迅速になる。パルスした電圧モードで操作するとき、電源は好ましくは約50HzからkHzの範囲まで調整できる周波数で、また約10〜30kVのrms電圧出力で方形波パルスを出力する。MHzの範囲でも、さらに高いパルス周波数を、いくつかの応用のために合わせることもできる。

図1に示したシステムの説明を完成させるには、システムの検出器44を、チューブ中の光学検出ゾーン46を通して移動する生体分子を光学的に（例えばUV吸収または蛍光）モニターするために、チューブのアノード端部付近に設置する。検出器はUVまたは可視吸収検出用および/または蛍光検出またはラジオアイソトープ検出用に設計することができる。UV吸収は、例えばフローセルをキャピラリーホルダーと共に有する、アブライド・バイオシステム・モデル270キャピラリー電気泳動システムに組み込まれたUV吸収検出器を用いて、200〜280nmで一般に行うことができる。

蛍光検出は好ましくは、下記に述べるように、生体分子に関連する蛍光種によって、約240〜500nmに調整できる選ばれた励起波長で行われる。蛍光検出器の一例は、ヒューレット・パッカード（パロ・アルト、CA）から入手でき、

るであろう。試料収集は例えばフラグメントを排出できる一連のカソード貯蔵器を用いることによって行われる。

## II. 粘度特性

ポリマーまたはコポリマー溶液の粘度は、従来のキャピラリー電気泳動器具に見いだされる圧力を用いるキャピラリーによって溶液を引っ張るまたは押す速度を決定する本発明のファクターである。キャピラリーを通る溶液の流速は逐次分析の間に溶液マトリックスを置換するためにどの位の時間が必要であるかを決定する。過度の置換時間は本発明の実用性または利便性を小さくする。キャピラリーチューブの端部間の圧力Pによって、長さL、そして半径rのキャピラリーチューブを通して移動する粘度ηの流体の流速vは、ポアズイユの式：

$$v = \pi p r^4 / 8 L \eta$$

によって表される。

この式はキャピラリーチューブ中の全容量を置換するため、時間tを要する溶液の粘度を計算するために再配列することができる：

$$\eta = \pi p r^4 / 8 L v$$

例えば、50cmの長さ（L=50）、50μmの直径（r=0.0025cm）のキャピラリーに20\*Hgの圧力（p=0.676バー）をかけると、30分（t=1,800秒）（この時間は従来のキャピラリー電気泳動には多すぎると考えられていた。）以内で置き換えられる容量をもつように38センチポワズ（η=0.38ポワズ）以下の溶液粘度を必要とするだろう。

ポリマー/コポリマー溶液の粘度は本発明ではポリマーの分子量と溶液中のその濃度によって決定される。溶液の比粘度ηspは一定の調整された圧力および温度にてキャピラリーチューブを流れるように、ポリマー溶液について時間t、および水について時間t0を測定して計算される。AB1モデル270キャピラリー電気泳動は20\*Hgの圧力と30℃の温度の場合にはキャピラリー粘度計として用いられる。比粘度は次のように計算される：

$$\eta_{sp} = (t/t_0) - 1$$

2%溶液の標準MW線状ポリアクリルアミド類（アクリルアミド分子の線状重合によって形成されるポリアクリルアミドは広範囲の分子量で入手できる；ポリ

キャピラリーチューブ検出用に上述のように改良されたHP1046A検出器である。

この検出器は電気泳動ピークを記録するため積分器/プロッタ45に連結する。

ラジオアイソトープ検出は、<sup>3</sup>Hまたは<sup>14</sup>C用の改良されたHPLCアイソトープ検出器を使用して行うことができる（Radiomatic Instruments & Chemical Co., Inc., Meriden, CT）。

操作には実施例2に詳述したように、貯蔵器32を真空にしてキャピラリーチューブに適当な洗浄とすすぎの溶液を引き出し、このチューブを完全に洗浄する。本発明の実施においてポリマー含有電解液溶液それ自体は試料工程間のシステムをフラッシュするために使用することができる。ポリマー含有電解液とは異なる洗浄液を使用する場合、次にチューブに若干量の電解質ポリマー溶液をフラッシュする。少量の一般には1〜10ナノリットルの試料物質をカソードチューブ端部に真空注入によって塗着する。生体分子ピークがすべて検出ゾーンを通過するまでカソードとアノードの貯蔵器の間に電圧をかける。

図2はパルス電界の下に電気泳動工程の端部まで操作できる電気泳動システム50の断面図を示す。システムのキャピラリーチューブ52は、56で示した検出ゾーンの付近の上流で小さいクリアランスブレイク54を有する。ブレイクのいずれかの側のチューブ部はチューブの内外に電気泳動により移動する有孔のガラススリーブ58によって連結されている。チューブの連結部は適当なポリマー含有電解液62を充填した貯蔵器60内に密封する。貯蔵器の接地電極64は負の側が適当なカソード貯蔵器と連結されているパルス電圧電源66の高圧側に連結する。接地電極64は負の側が適当なアノード貯蔵器と連結されているDC電源68の高圧側に連結する。

操作する際、チューブのカソード端に試料物質を充填した後、パルス電圧電源を所望の電圧と周波数レベルに調整し、DC電源を所望の電圧レベルに調整する。試料中の生体分子をブレイク54の上流内のパルス電場下に分離する。その後、フラグメントをパルス周波数ノイズ効果なしに光学的に検出できる検出ゾーンを通過して一定電圧の電界にフラグメントを運搬する。

ここでは示していないが、予備の電気泳動用の分離された生体分子を収集するためにも電気泳動システムを容易に適合させることができることは高く評価され

サイエンシズ・インコーポレイテッド、ウォリントン、PA）を使用して、図13において比粘度（上述のように測定した）の対数と分子量の対数との間に良好な線状の相関性が認められる。この相関性の勾配は1.042であり、従来技術に従って、この粘度は溶液中のポリマー/コポリマーの大きさを直接測定される。従って、38センチポワズ（比粘度30）以下の粘度の我々の例を用いると、2%のポリマー溶液は過剰な置換時間避けるため約790,000以下のMWのポリアクリルアミドを使用する必要がある。

ポリマーまたはコポリマーの濃度が溶液中に増加する場合、溶液の粘度が対応して増加する。この事実は図14に示され、溶液中の367,000ダルトンMWの線状ポリアクリルアミド（ポリサイエンシズ・インコーポレイテッド）の比粘度の対数と%（w/v）との間に良好な線状の相関性がある。そこで、30以下の比粘度の例では、367KDポリアクリルアミドは過剰の置換時間避けるため約3.1%（w/v）以下で溶液中に存在する必要がある。

ポリマー/コポリマーの粘度と濃度の間の関係は、混合物中の生体分子を分解するために高い濃度を要する場合、低分子量のポリマー/コポリマーを使用して粘度を低く保つことができることを示唆している。逆に、さらに低い濃度パーセントのポリマー/コポリマーではさらに高い分子量のポリマー/コポリマーを使用することができる。

ポリマーまたはコポリマーのMWは多くの異なる方法によって調整される。第一は、重合の条件を最終のポリマー生成物のMWに変化を与えるために変える。コポリマー/ポリマーの粘度平均MWは（1）反応温度を増加し、（2）メタノールのような反応混合物中の水混和性溶媒の中味を増加し、または（3）開始剤の濃度を増加して、減少させる。作られる特定のポリマー/コポリマーに依存して、他の重合条件または添加剤を使用してMWを調整するので、反応条件の上記リストは全部を含むものではない。

ポリマー/コポリマーの平均MWを調整する第2の方法は、異なるMW画分に多分散ポリマー生成物を分別し次いで単離および精製する。ポリマー/コポリマーの水溶液は（1）大きさによるクロマトグラフィー分離（例えばゲル浸透クロマトグラフィー）、（2）規定されたMWカットオフの膜を用いる透析、または

(3) メタノールのような水混和性溶媒を用いる分別沈澱によって分離される。  
ポリマー/コポリマー溶液の濃度は(1) 特定容量の水性緩衝液に異なる重量の固体ポリマーを添加して固体が完全に溶解するまで混合して、または(2) 異なる重量または容量の濃縮した水性ポリマー溶液を特定容量の水性緩衝液に添加して濃縮物が完全に分散するまで混合して、調整される。

ポリマー/コポリマー MW および/または溶液中のその濃度の上限は、主としてキャピラリーを通過して押すかまたは引っ張ることができるさらに上の粘度によって、指示されるであろうことは明かである。このさらに上の粘度は先の等式で表されるような器械のパラメーターによって用意される。従って、例えば、キャピラリー電気泳動に半径の大きい ( $r = 0.01 \text{ cm}$ ) 短いキャピラリー ( $L = 20 \text{ cm}$ ) を用いた場合、約 38625 センチボワズの粘度の溶液を高圧 ( $P = 100 \text{ psi} = 5.87 \text{ バール}$ ) にて 30 分でキャピラリーに運送することができる。図 13 のデータを用いる (粘度対数対ポリアクリルアミド濃度) と、さらに高い濃度は  $MW = 367 \text{ KD}$  のポリアクリルアミドに対して約 9% ( $w/v$ ) である。明らかに、さらに低い MW のポリアクリルアミドを用いると、さらに高い濃度に対する溶液をキャピラリーに運送ことができ、20% ( $w/v$ ) に近い濃度を使用できることを予期することは非現実的ではない。

上記の関係から明らかなように、さらに高い圧力を有する器具は、さらに低い圧力を発生する器具に関係する所定の濃度のポリマーに対し一層高い流速を与えることができる。さらに例として、大きい直径のキャピラリーは小さい直径のキャピラリーチューブに対して大きい流速を与えることができる。流速に影響を及ぼす要素は流速に影響を及ぼす上記のパラメーターに基づき処理することができる。

#### III. ポリマー溶液と電気浸透流

ポリマー溶液マトリックス中の電気浸透流の現象は、キャピラリー電気泳動チューブ 70 の拡大した断片部分を示している図 3 を参照して正味の負の電荷をもつ内側のキャピラリーチューブ壁に対して記載される。

図 3 に見られるように、「-」の符号で示した、チューブ内壁の負に荷電した基が、チューブ内の流体カラムの周りに正に荷電したシェルを基本的に形成する

一般に、本発明の方法に用いられるポリマーまたはコポリマーは分子量が 20 と 5,000 キロダルトンの間である。本発明方法に有用なポリマーおよびコポリマーの例には次のものを含む：ポリアクリルアミド類、例えばポリアクリルアミド、ポリ (N, N-ジメチルアクリルアミド) およびポリメタクリルアミド；ポリオキシド類、例えばポリエチレンオキシドおよびポリプロピレンオキシド；ポリエーテル類、例えばポリビニルメチルエーテル；ビニルポリマー類、例えばポリビニルピロリジン、ポリビニルアルコール、およびポリビニルアセテート；天然ゴム類または多糖類、例えばキサンタン、デキストラン、寒天、グアールおよび澱粉類；セルロースポリマー類、例えばメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、およびヒドロキシプロピルヘメチルセルロース；およびアクリルポリマー類、例えばポリヒドロキシエチルメタクリレートおよびポリエチレングリコールモノメタクリレート。ポリマーおよびコポリマーの混合物も本発明の実施において使用することができる。

選択されたポリマーまたはコポリマーの電荷パーセントは多くの方法で達成することができる (実施例 1)。本発明の方法においてホモポリマーを使用する場合、それらを改変して特定の電荷パーセントを含むようにする。重合後または重合中に、ホモポリマーを、例えばビニルアミンを生成するようにポリアクリルアミドにホフマン分解を行い (クリック)、改変して所望の平均電荷パーセントを含むようにする。ホモポリマーの例は、広範囲の分子量で入手でき、ポリアクリルアミド分子を形成するように過硫酸アンモニウムの存在で線状に重合されたポリアクリルアミドである。

コポリマーもまた本発明の方法では有用である。コポリマーのひとつの利点は所望の電荷基を含むようにサブユニットのひとつを特に選択することができることである。このサブユニットは次に他のサブユニットとの重合反応に所定の濃度で添加して、所望の電荷パーセント特性をもつコポリマーを生成することができる。例えば、アクリルアミド ([AA]) およびテトラメチルエチレンジアミン (TBEMED)、またはアクリルアミドおよびジアリルジメチルアンモニウムクロリド (DADMAC) のコポリマーは、実施例 1 および 2 に記載したように生成することができる。これらのコポリマーは広範囲の電荷パーセント値、なら

ポリマー電解質溶液中に存在する緩くまたは強く結合した正に荷電したイオンによって遮蔽されている。壁表面で正のイオンのシェルの厚さは電気二重層として知られている。この電気二重層はキャピラリー壁にて電位の基準であるゼータ電位によって特徴づけられる。

電界の影響下で、(正の電荷のシェルによって囲まれている) 媒体中のポリマー溶液のこのカラムは正のシェルの移動方向に (すなわち、カソードの方へ) 電気浸透流により引き出される。チューブ内の電気浸透流の速度は図中の矢印  $e$  で示される (矢印  $e$  は大きさ  $e$  のベクトル及びチューブ軸に沿った方向と考えることができる)。キャピラリーチューブ内の電気浸透流の速度  $e$  は次式で表される：

$$e = \frac{\epsilon \kappa E}{4 \pi \eta}$$

式中の  $\epsilon$ 、 $\kappa$ 、 $\eta$ 、および  $E$  はそれぞれ、二重層の誘電率、その粘度、ゼータ電位；および電界強度である。

本発明の方法では、電解質溶液中のポリマーまたはコポリマーは逆に荷電したキャピラリー壁に結合するために十分な電荷パーセントを有する。この結合は電気二重層の誘電率を減少し、または粘度を増加し、またはその両方によって、キャピラリーチューブ中の電気浸透流を有意に減少または除去する。電気浸透流の水準を十分に下げてバンドの現実的なテーリング、または広がりのない、すなわち分解率を下げることなく分離生体分子の別々のピークまたはバンドを可能にしなければならない。上述したように、本発明の方法による生体分子の分離は電解質溶液中のポリマーおよび/またはコポリマーによって与えられる篩分効果を支配的に信頼する。電気浸透流の特定のポリマー/コポリマー溶液における電荷パーセントの効果は次のように評価することができる。

電気浸透流は一般に一定のポリマー/コポリマー電解質溶液を含有するキャピラリーチューブによって電気的に中性の物質の移動度 ( $\text{cm}^2/\text{秒} \cdot \text{V}$ ) として測定される (実施例 2)。

#### IV. 生体分子の分離

本発明の分離方法はポリマー含有電解質溶液の配合において多数のポリマーおよびコポリマーを用いることができる。

びにある範囲の粘度値をカバーすることができる。

実施例 1 および 2 の反応機構において他の型のアクリルアミドを置換することによって、他の型の荷電したコポリマー、例えばポリ (メタクリルアミド)、ポリ (N-メチルアクリルアミド) またはポリ (N, N-ジメチルアクリルアミド) を合成することができる。例えば、ポリマーは N, N-ジメチルアクリルアミドおよびテトラメチルエチレンジアミン (TBEMED) のコポリマーであることができ、コポリマーの分子量は約 200 と 800 キロダルトンの間であり、ポリマー分子は N, N-ジメチルアクリルアミドのサブユニットにつき第 3 アミンテトラメチルエチレンジアミンを 0.03 ないし 0.6% 含む。

さらに、グラフトまたはブロックコポリマーも本発明の実施に有用である。水性グラフト荷電ポリマーは荷電していないポリマーの存在で荷電したコポリマーの重合によって生成することができる。このようなグラフト反応の 1 例はデキストランへのアクリルアミドと DADMAC のグラフトコポリマーについて実施例 1 D で示されている。

本発明のポリマーおよびコポリマーの改良に有用な荷電した基またはサブユニットは次のものを含む：第 1 アミン類、例えばビニルアミン、グルコサミン；第 2 アミン類、例えばエチレンジアミン；第 3 アミン類、例えばビニルピロリジン、およびテトラメチルエチレンジアミン (TBEMED)；第 4 アミン類、例えばビニル-N-メチルピロリジン、N, N-ジメチル-3, 5-メチレンビスピロリジン (DADMAC)；カルボン酸類、例えばアクリル酸、メタクリル酸、およびリンゴ酸；スルホン酸類、例えばビニルスルホン酸；リン酸類、例えばビニルリン酸；硫酸類、例えばビニル硫酸；およびホスホン酸類、例えばビニルホスホン酸。

実施例 2 の反応機構において、DADMAC に対し荷電したサブユニットの他の型を置換することによって、他の型の荷電したコポリマーを合成することができる。例えばポリアクリルアミドは次の化合物から誘導された低いパーセントの荷電したサブユニットを含む：[3-(メタクリロイルアミノ)プロピル]トリメチルアンモニウムクロリドまたはサブユニットの 2-メタクリルオキシエチル (トリメチルアンモニウム) クロリド。同様に、実施例 1 の TBEMED は、ポリアクリルアミド、例えば 2, 2'-アゾビス (2-メチルプロピオンアミジン)

ジクロリドに荷電した基を導入する等しい反応性の化合物によって置換することができる。

例えば、ポリマーはアクリルアミドおよび〔3-（メタクリロイルアミノ）プロピル〕トリメチルアンモニウムクロリドのコポリマーであることができ、コポリマーは約200と600キログルトンの間の分子量を有し、ポリマー分子はアクリルアミドのサブユニットにつき0.01ないし0.2%の第4アミンN-〔（プロピル）トリメチルアンモニウムクロリド〕メタクリルアミドを含む。

荷電した基を含有する上記分子は当該分野で知られている方法によってホモポリマーに配合することができる（実施例1参照）。本発明に有用なポリマーおよびコポリマーはまた正および負の両方の電荷基を含む両性ポリマーであることができる；異なる荷電したユニットを同じポリマーに導入し、正と負の電荷基のミックスを含ませることができる。例えば、ポリマーまたはコポリマー分子は少なくとも第1アミン、第2アミン、および／または第4アミン基、および少なくともカルボン酸、スルホン酸、リン酸、硫酸、および／またはホスホン酸基を含むことができる。このような両性ポリマーの使用は、例えば、ポリマーの正の電荷が非共有的に負のキャピラリー壁と結合することができるので分離に有用であり、ポリマーの僅かに負の電荷が電荷反発によって分離を改善することができる。溶液中では、ポリマーの正と負の電荷もまた非共有的に結合し、マトリックスの細分けの性質を改良することができる。

いくつかの場合において、上記の荷電した基を含有する分子はまた、例えばアクリルアミドとDADMACについて実施例1で示したように、コポリマーに直接配合することもできる。

実施例2はアクリルアミド（[AA]）とTEMEDまたはDADMACのコポリマーの使用を記載する。電気泳動流の速度は中性マーカーを使用して測定した。[AA]に対するTEMEDまたはDADMACの割合は図4と5の下部に示した値の範囲で変化させた。TEMEDおよびDADMACの両者の場合において、電気泳動流（EOF）の速度は0.05%の電荷パーセントの値で有意に減少した（約 $2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{sec} \cdot \text{V}$ 以下）。

図4は、重合反応において増加するTEMED濃度の粘度とEOFの効果を示

実施例3は生体分子の分離のために多くのコポリマー溶液を使用することを記載している。タンパク質の混合物の分離は本方法の分子篩分け性能を示すために使用した。図6は次の成分を有するタンパク質混合物を別々のピークに分離することを示している： $\alpha$ -ラクトアルブミン（14 k d）、トリプシン阻害剤（20 k d）、卵アルブミン（45 k d）、牛アルブミン（66 k d）、および $\beta$ -ガラクトシダーゼ（116 k d）。図6では、左から右へのピーク順は、それぞれ前記タンパク質に対応する。分離のために使用したDADMAC/[AA]%は各電気泳動図の右側に示される。図6から認められるように、0.26、0.1、ないし0.05%の範囲での電荷パーセント値はタンパク質混合物中の各タンパク質の分離にすべて有効である。コポリマー電解質溶液（図6）の分離能力を同じコポリマー溶液（図5）のEOFと比較すると、0.26、0.1、および0.05%の各値は $2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{sec} \cdot \text{V}$ 以下のEOF移動値を有することを示している。

0.26%の値では、ベースラインがかなり下方に傾いているが、長い走行時間でデータが不明瞭になったためである。一般に、電荷パーセントの上限は有意のベースラインの不安の原因（すなわち、傾斜、スパイク等）とならない値として決定される。これはポリマーの種類に依存するが、この上限値が1%を超えることはめったにない。

図7は上記タンパク質混合物の別々のピークへの分離を示す。分離のために使用されるDADMAC/[AA]%は各電気泳動図の右側に示される。図7から見られるように、0.02%およびそれ以下の電荷パーセント値は、バンドがかなり広がり濃度がなくなっているためタンパク質混合物中の各タンパク質の分離には効果がない。コポリマー電解質溶液の分離能力（図7）を同じコポリマー溶液のEOF（図5）と比較すると、0.02%およびそれ以下の値の各々は $2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{sec} \cdot \text{V}$ 以上のEOF移動度値をもつ。

生体分子の混合物の成分の分離に加えて、本発明の方法はまた選択された生体分子の分子量の決定に有用である。実施例3は選択された分子量の標準に対する既知のタンパク質の標準の相対的移動に基づく分子重量校正曲線の生成を記載する。図10は $\alpha$ -ラクトアルブミン（選択された参照標準）に関してタンパク質の標準の移動に対する対数（MW）の校正曲線を示す。既知の分子量と電荷を有す

す。EOFを測定するため2%（w/w）の一定のポリアクリルアミド濃度を用いると、TEMED%の増加と共にEOFは減少し、図4に示した結果は約0.05%ないし0.5%の範囲をカバーする電荷パーセント値に対しEOFは $2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{sec} \cdot \text{V}$ 以下であることを示している。ポリマー溶液の粘度はTEMED%の増加と共に減少し、約0.2%以上の比較的一定の値であった。これらのデータは正の電荷パーセントでは増加し、粘度では増加がなく、その結果EOFが減少したことを示す。

図5は重合反応においてDADMAC濃度を増加すると2%（w/w）ポリアクリルアミドの粘度とEOFに影響があることを示している。図5に示される結果から見られるように、EOFはDADMAC%の増加と共に減少し、約0.05%ないし0.26%の範囲にわたる電荷パーセント値に対し $2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{sec} \cdot \text{V}$ 以下である。ポリマー溶液の粘度はDADMAC%の増加と共に増減するが、同じ範囲の0.05ないし0.26%では線状の形で増加する。0.05%ないし0.5%の範囲での電荷パーセント値を有するDADMAC/[AA]コポリマーは異なる寸法および／または形状をもつ広範囲の生体分子の分離のために有用である。従って、このデータはまたEOFの減少が正の電荷の%の増加に起因し、粘度の増加に起因しないことを示している。

実施例2に記載された方法は、減少したEOFを得るために、本発明の方法を実施する際に使用されるポリマーまたはコポリマーに含まれる電荷パーセントのコントロールに有用である。

生体分子の分離のために、キャピラリーチューブは一般に、（a）20と5,000キログルトンの間の分子量、および（b）全ポリマーサブユニットに対し荷電したモノマーサブユニットのモルパーセントによって測定されるような0.01ないし1.0%の間の電荷パーセント、を有する少なくとも1のポリマーまたはコポリマー種を含有する非架橋の親水性ポリマーまたはコポリマー溶液の重量に対し0.05ないし30重量%（w/w）を含有する電解質溶液で充填される。溶液中のポリマーまたはコポリマーの電荷は選択された電気泳動pHで壁電荷と正反対である。

図4と5に示される結果は、EOFの減少の原因であるものは粘度ではなく、むしろポリマー／コポリマー分子の電荷パーセントであることを示している。

任意の数の化合物を相対的移動を確立するように参照標準として使用することができる；例えば、荷電した有機分子、染料、核酸、タンパク質、および他の荷電した生体分子。実際に、未知の分子量を有する化合物の移動は選択された参照標準、例えば $\alpha$ -ラクトアルブミンに関して決定され、次に分子量は標準曲線と比較して決定される。

実施例3Cは本発明の方法の再現性を示す。3%w/vのアクリルアミド／TEMEDコポリマー溶液を使用してタンパク質標準物の混合物を分離した。50の逐次実験をタンパク質の同じ混合物を用いて行った。各実験の間にアクリルアミド／TEMEDコポリマー溶液を用いてキャピラリーをフラッシュした。分離の結果を実験1、30および50に対して図11に示す。図11からわかるように、タンパク質混合物の成分の分離は本発明の方法によってきわめて再現性がある。

実施例3Dでは生体分子の相対移動度に関して溶液中のポリマー／コポリマーのパーセント濃度を変化させる効果を試験した。ポリマー／コポリマーの濃度パーセントが変化するとき、タンパク質標準物間の相対移動度の差が同様に変化する（図15）。各タンパク質標準物に対する図15の線の傾斜は分子量に比例し、これはポリマー／コポリマー溶液が真の篩分けマトリックスを提供していることを示す。また、この方法は所定の生体分子に対する分子量を決定するための別の方法でもある；分子量標準物の直線の傾きのプロットに対し未知の生体分子のための傾きを比較する。図15の相対移動度は $\alpha$ -ラクトアルブミンの移動、すなわち、各標準タンパク質の移動時間によって分けられた $\alpha$ -ラクトアルブミンの移動時間に関して特定のタンパク質の移動速度である。

実施例4は制限消化フラグメントの混合物におけるDNAフラグメントの分離を示す。 $\phi$ X174 R F HaeIII消化フラグメントは0.24の電荷パーセントにてTEMEDを用いて作られたポリアクリルアミドを用いる本発明の方法によって分離された。11  $\phi$ X174 R F HaeIII消化フラグメントの大きさは72から1353塩基対までの範囲である。図12は3種のコポリマー濃度1、2および3%について得られた電気泳動図を示す。図12のデータはポリマー／コポリマーの濃度パーセントの増加はこの技術の分離能力に影響を与える本発明の方法の性質を示している。図12に見られるように、コポリマー濃度が増加すると、 $\phi$ X174 R F Hae



III 271 および281 塩基対のフラグメントに対応するピークの分解が改善する：2%で分離が始まり3%でピークは良く分解される。この例は溶液中のポリマーの濃度パーセントをどの位にすると分解に影響するかを示す。

#### V. 分離条件の最適化

キャピラリー電気泳動における電気浸透流と分子分離の調整のための本方法に有用なポリマーの特性は次のものを含む：

1. 少なくとも1のポリマーまたはコポリマー種を含有する非架橋親水性ポリマーまたはコポリマー溶液の重量に対し0.05ないし30重量% (w/w) 含有する電解質溶液；

2. ポリマーまたはコポリマー種は20と5,000キログルトンの間の分子量を有する；そして

3. ポリマーまたはコポリマー種は全ポリマーサブユニットに対し荷電したモノマーサブユニットのモルパーセントによって測定されるとき0.01ないし1.0%の間の電荷パーセントを有し、荷電したモノマーサブユニットは選択された電気泳動pHで壁電荷と逆の電荷を有する。

任意の選択されたポリマー、コポリマー、またはそれらの混合物に対して、電荷パーセント値は、電気浸透流が優先して $2 \times 10^{-8}$ 以下まで減少する値を見出すため、実施例2に記載したように電荷パーセント値の範囲を本質的に選択することによって最適にすることができる。選択されたポリマーまたはコポリマー溶液の後続の試験は標的の生体分子試料の分離である。溶液中のポリマー/コポリマー% (w/w) は生体分子の選択された混合物（例えば、上記タンパク質またはDNA混合物）の成分を分離するように調整する必要がある。溶液は標的の生体分子の大きさに基づき成分を分離しなければならない。

特定の電荷%を有し、または選択された% (w/w) の溶液中でポリマーまたはコポリマーを使用することに加えて、フラグメントの移動速度を次の方法によって選択的に調整することができる：

1. 電界力の変更。移動時間およびある程度まで分解能は約100ないし400V/cmにて分離を行うことによって調整される。

2. 溶液pHの変更。生体分子、特にタンパク質は、異なるpH値で異なる正

味の電荷を呈することができる。約pH4ないし10の間にポリマー溶液のpHを調整することによって、相対移動速度を変えることができる。

3. 温度の変更。移動時間および分解能は約10ないし60℃の温度で分離を行うことによって変えることができる。低い温度は一般に分解能を改善する。

4. 緩衝液型の濃度またはイオン力の変更。ポリマー/コポリマー溶液に使用される所定の緩衝液種のいずれかに対して、最大分解能に対する最適の濃度範囲が存在する。バンドの広がり低すぎる濃度（低いイオン力）で生ずるかまたはバンドの広がり高すぎるイオン力で生ずることができる。特に両性イオン緩衝液は分解能を改善しバックグラウンドUV吸光度変化を減らす。

5. 緩衝液への界面活性剤の添加。中性、陽性、または陰性に荷電したヘッド基をもつハイドロまたはフルオロカーボンの界面活性剤の混入は選択的にタンパク質の移動度を変える。特に、緩衝液中に、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) が存在すると、タンパク質分子量に比例した移動度となる。

6. 緩衝液への変成剤の添加。一本鎖または二本鎖DNAの変更された移動度および分解能の改善は電解質緩衝液に尿素またはホルムアミドのような変成剤を添加して行うことができる。

上記をまとめると、本発明は、生体分子分離を高めるように選択的に変えることができる種々のパラメーターを与える。生体分子移動速度はポリマーの性質およびその濃度、溶液のpH、分離温度および電界の強さ、および緩衝液配合を変えることによって選択的に変更することができる。核酸に対して、移動速度はフラグメントを非イオン性内塩添加剤、例えば臭化エチジウムまたはアクリジノオレンジと錯体を形成させて選択的に変更することができる。分解能は尿素およびホルムアミドのような変成剤を添加して改善することができる。

#### VI. パルス電界分離

上述の電気泳動法を定電圧電界で行った。本発明の他の面によれば、生体分子、特に、核酸フラグメントの分別は、所定の大きさのフラグメントの範囲内で選択的に分離を高めるために有効な周波数にて、パルス電圧電界の下に電気泳動分離を行うことによって高められる。

理論では、パルス電界における核酸フラグメントの移動速度の挙動は2つの大

きに関連した効果によって支配されているのかも知れない。第一の効果はフラグメントの回転モードと電界の周波数を含む共振効果である。以下の表1は100、1,000、および10,000塩基対の二本鎖DNAフラグメントについて計算した回転および延伸の共振周波数を示す。H<sub>0</sub>で表した回転共振周波数は二本鎖分子の扇長・長円モデルを基礎として計算した（マシュエラ；カンターら）。

表1

モデル	フラグメントの大きさ (塩基対)		
	100	1,000	10,000
扇長・長円 (回転運動)	$9.9 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$	$2.2 \times 10^6$
粘弾性 (延伸運動)	$3.8 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$	$1.7 \times 10^6$

強力な回転共振効果は、電界との共振でのフラグメントの移動速度が時間不変の電界での移動速度に関連して優先的に遅くなることを予測している。これは電界と回転共振する分子が、平均して、電界が最大になるとき電界方向に移動するために最も少なく有利に配向することが期待されるためである。より遅い回転時間のため、より大きい分子は、各電圧パルスサイクルで電界配向位置からあまり揺動しないことが期待される；より小さい分子は、より速い応答時間をもち、電界方向に一層迅速に再配向する。従って、もしも回転共振効果が支配的であるならば、非共振種の移動速度に比例して電気泳動中に共振種の移動を遅くすることが可能でなければならない。

パルス電界で期待することができる第二の大きさによる効果は各電圧パルスと共に流体中のフラグメントの加速と減速による慣性効果である。この効果は図9に示されており、この図はパルス幅と最大電圧 $V_{max}$ を有する印加方形波電圧に関して、比較的小さい核酸フラグメント（点線）と比較的大きい核酸フラグメント（一点鎖線）に対する仮定的な速度曲線を示す。フラグメントが達しなければならない最大速度は電位 $V_{max}$ の定電圧電界におけるフラグメントの終端または定常状態の速度、すなわち100%の一定電界移動速度である。

図から見られるように、より小さいフラグメントは電圧パルスの印加後は大きいフラグメントよりも速く終端速度に達することが期待されるが、電圧パルスが

終わるときに同じ速度で実質的にゼロ電圧に減速することが期待される。電圧パルスの間に各フラグメントによって移動される全距離はまさに速度曲線の積分であるから、より大きいフラグメントの移動速度はパルス電圧電界で優先的に減少することが期待される。また、速度曲線での任意の遅延の効果が短いパルスで目立つようになるので、パルス周波数が高くパルス持続時間が短い程、フラグメントの大きさが小さく、その移動速度において優先的に遅らせることができることは高く評価できる。

いくつかの生体分子の混合物、特に核酸フラグメントにおいて、異なる大きさの範囲で種を分別しようとする場合、上記の変数は—溶液のpH、およびポリマーの種類および濃度、電界周波数および変性剤を含めて—電気泳動の走行中にフラグメントの分解能を高めるように選択的に変えることができる。例えば、電気泳動分離は大きさがより大きいフラグメントを分離するために、最初に一定の電界または低い周波数で行い、次に大きさがより小さいフラグメントの分離を進めるためにより大きい周波数にスイッチを切り替える。別の例として、キャピラリーチューブに引き出される連続的な溶液勾配を生み出すために標準二室混合装置を用い、ポリマー溶液のpHまたはポリマー濃度を電気泳動走行中に継続して変えることができる。

#### VII. 応用

本発明の分離法は生体分子の大きさによる分別を必要とする上述の種々の応用の何れかに有用性を見出す。これらの応用は、DNAの制限分析を含めて、タンパク質類、ポリペプチド類、ペプチド類および一本鎖および二本鎖核酸の電気泳動分離法を含む。

本発明の方法はDNA配列反応が蛍光タグ（ドロスマン）で標識を付けた核酸を含むDNA配列分析に適用することができ、これらの反応の生成物は本発明の方法によって大きさにより分離される。核酸分子は非変性または変性のいずれかの条件下に大きさにより分離することができる。代表的な変性条件は分離前の核酸におよび/または電解質溶液に尿素またはホルムアミドを添加することを含む。

さらに、本発明の方法はDNAの一本鎖配座多形性分析に用いることができる

(マキノ)。ポリマーゼ鎖反応方法(ムリス; ムリスら; Parkia-Elmer Cetus Corp.) もまた一本鎖配座多形性分析に応用することができる。この分析は一本鎖DNA分子が配列特異的であり鎖内相互作用によって安定化される配座を発現する原理に基づいている。一般的にこのような分析は非変性条件下、すなわち、一本鎖分子の配座特性を保持する条件下に行われる。一本鎖分子間の単一塩基の変化でさえも分子間の相対移動差を十分に検出するために配座を変えることができる。一本鎖DNA分子の大きさによる分離が行われる条件は一本鎖分子の移動度に影響を与えるように変えることができる。例えば、次のパラメーターを変えることができる: ポリマー%、ポリマーの型、グリセロール(一般的に約5%ないし20%、w/vの濃度で存在する)、および温度。

本発明の分離方法はまたポリマーゼ鎖反応増幅生成物の分析に対しても有用である。例えば、増幅反応は試料類型および選択されたプライマーを用いて行うことができる。生成物は、予想された大きさをもつ鎖的増幅生成物が、反応混合物中に存在する場合に決定するように大きさにより分離される。増幅反応生成物の濃度もまた決定することができる。

本発明の分離方法はまた核酸-タンパク質複合体の分析にも用いることができる。例えば、本方法は移動-シフトアッセイフォーマットに使用でき、選択されたヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを結合するための試料タンパク質の能力を、試料タンパク質の存在および不在においてポリヌクレオチドの移動度を比較して評価する。試料タンパク質へのポリヌクレオチドの結合は、得られたポリヌクレオチド-タンパク質複合体の移動度がポリヌクレオチド単独の場合とは異なるときに確認される。本方法はまた試料タンパク質とポリヌクレオチドとの間の結合の理論量を、ポリヌクレオチドに対する試料タンパク質の比を変えることによって決定するために使用することができる。簡単に、ポリヌクレオチドは蛍光タグのような特徴的なレポーター標識を含み、ポリヌクレオチド含有ピークを容易に同定し定量することができる。

制限消化生成物の分析の応用は次のものを含む: 遺伝子スクリーニング用の制限フラグメント長の多形現象の分析、ベクトル構造の確認、核酸プローブに対する大きさおよび/またはハイブリッド形成に基づく特定の核酸フラグメントの同

定、および化学的または酵素的配列に対する一本鎖フラグメントの分別。

次の応用は制限フラグメント分析のため本方法をどのように利用できるかを説明している。制限分析の例では、ゲノムフラグメントの混合物から、関係のある標的配列を含む制限フラグメントを同定することが望ましい。選ばれた一種またはそれ以上の制限酵素を使用してゲノム混合物を消化した後、フラグメント混合物を標的配列とハイブリッド形成することができるリポーター標識プローブとハイブリッド形成下に混合する。このプローブは好ましくは相補的標的配列および、蛍光プローブ検出器によって容易に検出できる蛍光プローブのような、共有結合したプローブを含む。このプローブは、例えば、一本鎖標識を含む標識変性/復元条件によってフラグメントとハイブリッド形成し、または二本鎖形成を生じさせるRecAによって二本鎖の形でフラグメントに結合することができる。

プローブをフラグメントに結合した後、試料は本方法にしたがって分離する。検出器は好ましくは二重波長モードで操作し、UV吸収と蛍光放出検出を同時に行う。

本発明の方法によって、タンパク質、ポリペプチド、およびペプチドは変性状態、自然状態、または化学的に改変した状態のいずれかにおいて、ポリマーおよび/またはコポリマー電解質溶液を含有するチューブ中で電気泳動によってそれらの大きさまたは分子量に従って分離される。この溶液をキャピラリー電気泳動によって分離するために用いるとき、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)変性タンパク質の高速および高分解分子量(MW)分離が得られる(図6および7参照)。標準タンパク質の分子量と相対移動時間を関連づけることによって、未知のタンパク質の分子量を算定することができる。

タンパク質と核酸の分離に加えて、本発明の方法はまた核酸/タンパク質複合体、例えばリボヌクレオタンパク質粒子、それらの同種のDNAに結合したDNA結合タンパク質、およびそれらの同種のRNA結合部位に結合したRNA結合タンパク質(例えばHIV-1のTATおよびREVタンパク質)の大きさによる分離に応用することができる。

高質量感度および再現できる移動時間は約0.01ないし1.0%の範囲の電荷パーセントを有するポリマーまたはコポリマーを用いて得られ、そこではポリマーま

たはコポリマーの電荷はキャピラリーチューブの内側表面の電荷と逆である。この組合せは約 $2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{秒} \cdot \text{V}$ 以下に電気浸透流を實質的に減らし、電気泳動中のタンパク質の吸着を避けるために役立つ。全ての応用に $2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{秒} \cdot \text{V}$ 以下に電気浸透流を減らすことは必要ではない; 電気浸透流の本質的な減少は約 $8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{秒} \cdot \text{V}$ で起こる。分離のために使用されるポリマー溶液は従来のキャピラリー電気泳動装置に見られる種々な圧力を用いてキャピラリーチューブに導入される。

生体分子を含有する試料を分離した後、キャピラリーは次の試料を分析する前に新しいポリマー溶液でフラッシュする。この工程は逐次試料を処理する際に汚染、または前の試料からの「ゴーストピーク」の可能性を排除する。新しいポリマー溶液で装置をフラッシュする能力はポリマー溶液の粘度を制限することにより可能となる。

分離溶液に使用されるポリマーまたはコポリマーは分子量が20と5,000キロダルトンの範囲内である。このポリマーの分子量は一般に、選択された生体分子の電気泳動による移動を遅延させるであろう絡み合い領域に対する域値を超えており、生体分子の分子量に比例している(グロスマン、米国特許第5,126,021号、1992年6月30日発行)。溶液中のポリマーまたはコポリマーの分子量は、従来のキャピラリー電気泳動装置に見られる圧力を用いて狭いキャピラリー(直径200  $\mu\text{M}$ 以下)に導入することができない高粘度の溶液において生ずる種よりも小さい。

ポリマーまたはコポリマー電解質溶液は有機または無機イオンも含むことができ、pHコントロールおよび光学安定性のために使用され、次のものを含む: 有機酸(例えばクエン酸、酢酸、塩酸)または双極性イオン(例えばTES(ネートリス[ヒドロキシルメチル]-2-アミノエタンスルホン酸)(シグマ)、BICINE(N, N-ビス[2-ヒドロキシエチル]グリシン)(シグマ)、ACES(2-[2-アミノ-2-オキシエチル]-アミノ)エタンスルホン酸)(シグマ)、グリルシグリン(シグマ); 無機酸(例えばリン酸); および有機塩基(例えば「トリス」(シグマ))。

変性分離を行うとき、アニオン界面活性剤もまたポリマーまたはコポリマー電

解質溶液に添加することができる。アニオン界面活性剤は一般にハイドロカーボンまたはフルオロカーボン硫酸塩(例えばドデシル硫酸ナトリウム(SDS))、スルホン酸塩(例えばデカンスルホン酸ナトリウム)、またはカルボン酸(例えばウリン酸)である。例えば、水で希釈したSDS変性タンパク質試料は、キャピラリーに動電学的に注入することができる。通常30cmの分離長と200V/cmの電解の強さを用いるとき、15分以下で分離は通常完了する。

240nm以下の波長でオンカラムUV検出を行うとき、双極性イオン緩衝液、例えばACES、またはTES(シグマ)は、ポリアクリルアミドおよびSDSをpH6ないし8で含有する分離溶液中で、バックグラウンドUV吸光度に安定化効果を与える。この安定化は過度なベースラインの傾斜なしで200nmにて繰り返せる敏感なUV検出を可能にする。

分子量によるタンパク質または核酸のキャピラリー電気泳動分離のための上記のようなポリマーまたはコポリマー溶液の使用は、(1)さらに短い分析時間、(2)全体として自動化した分離と検出、(3)定量分析、(4)極少量のタンパク質または核酸(ピコグラム)の非破壊分析、および(5)ユーザーに便利なマトリックス(すなわち、ポリマー溶液は予備試験されており、固体ゲルは準備しない)を提供することによって従来のPAGEスラブゲル分離を超える利点がある。

固体ゲルマトリックスでは、ゴーストピークは除くことが難しい。固体ゲルではまた、マトリックス中の不可逆的に結合した物質が次の分離において生体分子と相互に作用する傾向があり、従って分解能が下がる。本発明の方法の1の利点は、分離マトリックス、すなわち、ポリマー/コポリマー溶液を、各実験間で置換できることである。さらに本発明の利点は動電学的注入がキャピラリーに試料マスを導入するときに効果がないとき、真空または正の加圧によって行われる流体力学的注入を用いて試料マスをキャピラリー中に移動させることができることである。

本発明の方法に用いられる低い電荷を含むポリマーおよびコポリマーはキャピラリーチューブの内側の荷電した表面壁のコーティングとして、また生体分子のための分子篩分けマトリックスとして働く。

以下に示す実施例は本発明を限定するものではない。

#### 実施例1

##### 荷電したポリマーまたはコポリマーの合成

##### A. アクリルアミドとT.B.M.E.D.のコポリマー

変量分量のT.B.M.E.D. (N, N, N', N' -テトラメチルエチレンジアミン、アルドリッチ・ケミカル社) を、アクリルアミド (アルドリッチ・ケミカル社) の重合を開始する過硫酸アンモニウム (アルドリッチ・ケミカル社) に添加すると、変量する分子量 (図4の粘度データ参照) と電荷パーセント (図4のEOFデータ参照) をもつポリアクリルアミドを結果として生成した。次の例はアクリルアミドに対するT.B.M.E.D.のモルパーセントが0.24%であるポリアクリルアミドの合成を示す。T.B.M.E.D.のモルパーセントは、この実施例において重合混合物に添加する溶液中のT.B.M.E.D.の濃度を増加または減少させて増加または減少させることができる。

2リットルのフラスコに含まれる脱イオン水500mlに100gのアクリルアミドを添加する。この溶液は一定であるが静かにヘリウムを吹き込みながら50℃で15分間攪拌する。400mlのメタノール (バーディック・アンド・ジャクソン、HPLC等級) を添加して反応フラスコに水冷コンデンサを取り付けてさらに15分間攪拌を続ける。10% (v/v) T.B.M.E.D.水溶液10mlを添加し、2分間攪拌する。10% (w/v) の過硫酸アンモニウム10mlを添加し、2時間攪拌しながら重合を進行させる。

透明な粘性の液体反応混合物を3リットルのポリプロピレンビーカーに注入する。一定に手動で攪拌しながら、徐々に500mlのメタノールを添加する。得られた固体の白色の塊のポリアクリルアミドの沈澱をビーカーの底に沈澱させる。上澄み液を排出するようにデカントする。500mlのメタノールをビーカーに加え、ガラス棒で塊を手動で圧搾し、メタノールを塊のまわりに渦を巻かせて残りの物質を上澄み液中に洗い出して溺らせる。固体の塊を沈澱させて上澄み液を排出するようにデカントする。このメタノール洗浄法を3回以上、上澄み液が比較的透明になるまで繰り返す。

固体の塊を大きさが約1cm×2cmまたはそれよりも小さい小片に砕きまたは切

アクリルアミドコポリマーをマックコーミック (McCormick) に似た方法を用いてデキストランの主鎖にグラフトする。1.25gのデキストラン、8.155gのアクリルアミド、および0.66gのD.A.D.M.A.C.の水溶液を25℃で30分間ヘリウム下に攪拌する。0.0274gのセリウムアンモニウム硝酸塩を含有する10mlの0.05N硝酸を添加して重合を開始する。3時間後グラフトコポリマーをAに上述したように沈澱させて回収する。電荷パーセントはこの実施例 (すなわち0.05%) から、反応混合物に添加したD.A.D.M.A.C.の分量を増加または減少させることにより増加または減少させる。

##### B. ポリマーまたはコポリマー溶液

ポリマーまたはコポリマーを所望の緩衝液溶液 (w/v) に添加する。次いでこの溶液を約2時間静かに回転させて混合し、その後0.45ミクロンフィルターに通して溶液を濾過する。溶液を15分間29インチのHgにて30℃で脱気するため真空オーブンに入れる。次に溶液をキャピラリー電気泳動器具の検出器側と緩衝液側の貯蔵器に導く。

#### 実施例2

##### 比粘度と電気浸透流の荷電ポリマーまたはコポリマーの効果

A.B.1モデル270キャピラリー電気泳動システムを用いてキャピラリー電気泳動を行った。このシステムは30KVまでの電圧をセットできる組み込み高電圧DC電源を含む。システムに使用したキャピラリーチューブはポリマイクロ・テクノロジー (フェニックス、AZ) から入手した長さ50cm、内径55μm、外径350μmの溶融シリカキャピラリーチューブである。

電気浸透流の流速 (V<sub>eo</sub>) を示すために用いたマーカーは中性化合物、酸化メシチルであり、これは200nmでUV吸収を示す。電気泳動システムは30℃の温度で実験を通して約10kV (約+200 v/cm) の電圧設定で行った。UV検出はキャピラリーチューブ検出用に設計された組み込み783 UV検出器を用いた。検出器出力信号はスペクトロフィジクス Sp4400 積分器/プロッターで積分しプロットした。

新しいキャピラリー表面はキャピラリーを連続して5〜10キャピラリー容量の1.0N NaOH、3〜5容量の0.1N NaOH、および最後に3〜5容量のポリマー溶液を用いてフラッシュして日常的に調製させた。溶液をキャピラリーからアノード端

断して、これらの小片をポリプロピレントレイに置く。分離した小片を入れたトレイを真空オーブンに置き (VWR1430または同等) 24時間50〜60℃で約30" Hg真空度 (冷却蒸気トラップに連結したTrivac D2A真空ポンプまたは同等のものによって供給される) にて乾燥させる。乾燥したポリアクリルアミドの小片をマイクロミル (Bei-Arl, VWR サイアンティフィク) で顆粒粉末に砕きポリマー溶液を作るために使用するまで小さいガラス瓶に乾燥させて貯蔵する。

##### B. アクリルアミドとD.A.D.M.A.C.のコポリマー

変量分量のD.A.D.M.A.C. (ジアルリジメチルアンモニウムクロリド、アルドリッチ・ケミカル社) をアクリルアミドの重合を開始する過硫酸アンモニウムに添加すると、結果として分子量 (図5の粘度データ参照) および電荷パーセント (図5のEOFデータ参照) を変化させてポリアクリルアミドを生成することになる。次の実施例はアクリルアミドに対し0.05モルパーセントのD.A.D.M.A.C.を用いるポリアクリルアミドの作り方を示す。D.A.D.M.A.C.のモルパーセントはこの実施例に使用される溶液中のD.A.D.M.A.C.の濃度を増加または減少させて増加または減少させることができる。

ポリアクリルアミドの合成と回収は、T.B.M.E.D.の代わりに10mlの1.14 (w/v) D.A.D.M.A.C.水溶液で置き換えたこと以外は、上記例Aに明記したように行われる。

##### C. ポリアクリルアミド中のアミド基をアミンへ転換

小さいパーセンテージのポリアクリルアミド中のアミド基を対応する荷電したアミン基へ転換することは既知の Hoffman 分解 (Jen) を用いて行われた。40部の5.25%次亜塩素酸ナトリウムと2.3部の水酸化ナトリウムの溶液を20分かけて355部の20%ポリアクリルアミド水溶液に添加する。ポリアクリルアミドはT.B.M.E.D.を添加しないでAに上述したように調製する。30ないし37℃の温度と共に反応を30分間保持する。反応溶液をHClでpH6.9に中和する。ポリアクリルアミドをAに上述したように沈澱させて回収する。ポリアクリルアミドの電荷パーセントは全反応時間を増加または減少させることにより、増加または減少させる。

##### D. アクリルアミドとD.A.D.M.A.C.のコポリマーをデキストランにグラフト

部に組込み制御真空システムを用いて真空にして吸い出した。

一般に、選ばれたポリマー/コポリマー電解質溶液を用いて平衡にした後、2〜5 ml の中性マーカー (酸化メシチル) を検出器端部を真空にしてキャピラリーに注入した; マーカーは電気浸透流を測定するために使用する。電場を印加し (+200 v/cm) 検出器に移転する (30cm) マーカーに対し時間 (t, 秒) を記録する。

電気浸透流の移動度 (EOF) を次式のように計算する:

$$EOF = \frac{30 \text{ cm}}{200 \text{ v/cm}} \cdot \frac{1}{t}$$

生体分子は一般に動電学的に注入される。例えば、参照マーカーを動電学的に-5 kVで2秒間注入した後、生体分子の試料を、1mlにつき約0.01mgで、動電学的に-5 kVで10秒間注入する。次に特定の分離によって、一般には約-10kVないし約-20kVの適当な電圧を印加して実験を終了する。

##### A. アクリルアミドとT.B.M.E.D.のコポリマー

アクリルアミドとテトラメチルエチレンジアミン (T.B.M.E.D.) の混合物は、実施例1に述べたように、図4の下部に示されるT.B.M.E.D.対アクリルアミドモノマー ([A.A.]) パーセントで生成させた。コポリマー溶液は50mMのACBS、pH7.0および0.2% SDSから成る緩衝液中で生成させた。この緩衝液または他の適当な電解質溶液を使用してコポリマー電解質溶液を生成させることができる。ポリアクリルアミドの濃度は2% (w/w) であった。コポリマー電解質溶液の粘度は、上記のように、キャピラリー粘度計を用いて測定した。コポリマー電解質溶液を上記のようにキャピラリーチューブを通して真空で引っ張った。2ないし5ナノリットルの中性マーカー (酸化メシチル) をカソード末端に加えた真空によってキャピラリーに注入した。200V/cmの電圧を印加した。電気浸透流 (EOF) はcm<sup>2</sup>/秒・Vで計算したマーカーの移動度として決定した。

その結果を図4に示す。図4から分かるように、約0.05%ないし0.5%の範囲内のT.B.M.E.D./[A.A.]値で、EOF移動度は2×10<sup>-3</sup>cm<sup>2</sup>/秒・V以下に減少する: 2×10<sup>-3</sup>cm<sup>2</sup>/秒・VのEOF移動度の値は電気浸透流が極めて低レベルであることを反映している。

## B. アクリルアミドとDADMACのコポリマー

アクリルアミドとジアリルジメチルアンモニウムクロリド (DADMAC) の混合物は、実施例1に述べたように、図5の下部に示されるDADMAC対アクリルアミドモノマー ( [A.A.] ) パーセントで反応させた。コポリマー溶液は50mMのACES、pH7.0および0.2% SDSから成る緩衝液中で生成させた。この緩衝液または他の適当な電解質溶液を使用してコポリマー電解質溶液を生成させることができる。アクリルアミドコポリマーの濃度は2%であった。コポリマー電解質溶液の粘度は、上記のように、キャピラリー粘度計を用いて測定した。コポリマー電解質溶液を上記のようにキャピラリーチューブによって真空で引っ張った。2ないし5ナノリットルの中性マーカー (酸化メシチル) をカソード末端に加えた真空によってキャピラリーに注入した。+200V/cmの電圧を印加した。電気浸透流 (EOF) は  $\text{cm}^2/\text{秒} \cdot \text{V}$  で計算した中性マーカーの移動度として決定した。

その結果を図5に示す。図5から分かるように、約0.05%ないし0.26%の範囲内のDADMAC/[A.A.] 値で、EOF移動度は  $2 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{秒} \cdot \text{V}$  以下に減少する。約  $2 \times 10^{-3} \text{cm}^2/\text{秒} \cdot \text{V}$  のEOF移動度の値は電気浸透流が極めて低レベルであることを反映している。

## 実施例3

## 試料ポリベプチドの分離

## A. タンパク質分離

次のタンパク質の混合物をシグマ (セントルイス MO) から購入した:  $\alpha$ -ラクトアルブミン (14kd)、ダイズトリプシン阻害剤 (20kd)、卵アルブミン (45kd)、ウシアルブミン (66kd)、および $\beta$ -ガラクトシダーゼ (116kd)。混合物中のタンパク質は標準法 (アウスベルら) によってSDS変性させた。簡単に、1% SDS/1%メルカプトエタノール中1.0mg/mlにてタンパク質を煮沸水で15分間加熱した。分析する前にタンパク質を水で0.02mg/mlまで希釈した。

アクリルアミドとジアリルジメチルアンモニウムクロリド (DADMAC) の混合物を図6と図7に示したDADMAC対アクリルアミドモノマー ( [A.A.] ) パーセントで実施例1に述べたように調製した。コポリマー溶液は2.0%のドデ

シル硫酸ナトリウム (SDS) を含有した50mM ACES、pH7.0 から成る緩衝液 (シグマ) に生成させた。溶液中の線状コポリマーポリアクリルアミド/DADMACの濃度は2% (w/v) であった。コポリマー電解質溶液は上述のようにキャピラリーチューブによって真空で引っ張り、キャピラリーのカソード末端を試料混合物中に入れた。約1ないし2ナノグラムのタンパク質を $\sim 100 \text{V/cm}$ の電界強度によって10秒間キャピラリーに注入した。緩衝液貯蔵器中のキャピラリー末端を用いて、 $-200 \text{V/cm}$ の電界強度を印加した。分離は30℃で行い、タンパク質は200nmで検出した。キャピラリーチューブは55 $\mu\text{m}$ の内径と28cmの有効分離長を有していた。

DADMAC/[A.A.] で行われたタンパク質混合物の成分分離のためのCEの結果を示す電気泳動図は、図6と図7に示される。

## B. 寸法裁正

上記のタンパク質混合物は、3% (w/v) の溶液中、線状コポリマーポリアクリルアミド/TEMEDの濃度で0.24%のTEMED/[A.A.] を使用して、本質的に上記のように分離した。対数 (MW) を、混合物中の各タンパク質に対し $\alpha$ -ラクトアルブミンに関してタンパク質標準物の移動度 ( $\alpha$ -ラクトアルブミンの移動時間を問題のタンパク質ピークの移動時間によって割った) に対してプロットし、得られた校正曲線を図10に示す。

## C. 再現性

本発明の方法の再現性は、上記の条件下に試料を繰り返し注入して示され、キャピラリーは各試料の実験の間に20 $\mu\text{s}$ で10分間コポリマー溶液を用いてフラッシュした。全試料のタンパク質はシグマから入手した。溶液中に線状コポリマーポリアクリルアミド/TEMEDの濃度は3% w/vであった。TEMED/[A.A.] 濃度は0.24%であった。50回の逐次試料実験を行い、分離結果は実験1、30および50について図11に示す。

## D. フェーザン回帰分析

上記タンパク質混合物中の各タンパク質の相対移動度を多数のコポリマー濃度パーセントで $\alpha$ -ラクトアルブミンの移動度に関して決定した。この分析に使用したコポリマーは図15に示した溶液中の線状コポリマーポリアクリルアミド/T

EMEDの濃度範囲でTEMED/[A.A.] が0.24%であった。EC条件は上記と同じであった。

## 実施例4

## 試料核酸の分離

HaeIIIで消化した $\phi$ X174 RFをベテスダ・リサーチ・ラボラトリーズ (BRL) ガイサースバーグ MO) から購入した。 $\phi$ X174 RFのHaeIII制限消化は72ないし1353塩基対の範囲の大きさの11の二本鎖DNAフラグメントを生成する。試料をマイクロリットルにつき0.06マイクログラムに希釈した。アクリルアミドとTEMEDは実施例1に記載したように0.24モルパーセントのTEMEDにて調製した。コポリマー溶液は125 mM TES (シグマ)、pH7.0から成る緩衝液で生成させた。核酸分離のために使用した線状コポリマーポリアクリルアミド/TEMEDの濃度は図12に示される (1、2および3%)。コポリマー電解質溶液は上記のようにキャピラリーチューブによって真空で引っ張り、キャピラリーのカソード末端を試料混合物中に入れた。約1 $\sim$ 2ナノグラムのDNA制限消化混合物を10秒間、 $\sim 100 \text{V/cm}$ の電界強度によってキャピラリーに注入した。緩衝液貯蔵器中のキャピラリー末端を用いて、 $-200 \text{V/cm}$ の電界強度を印加した。分離は30℃で行い、DNAフラグメントは260nmの吸光度によって検出した。キャピラリーチューブは55 $\mu\text{m}$ の内径と28cmの有効分離長を有していた。

TEMED/[A.A.] で行われたDNAフラグメント混合物の成分の分離のためのCEの結果を示す電気泳動図は、図12に示される。

本発明は特定の方法および具体的にに関して記載されているが、本発明から逸脱することなく、種々の改良および変更を行うことができることは認められるであろう。

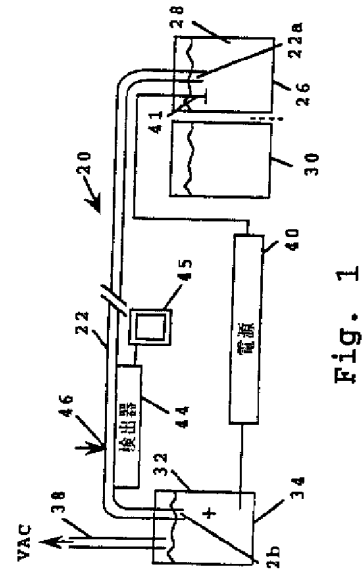


Fig. 1

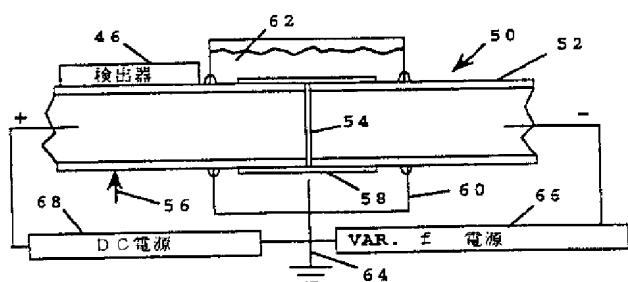


Fig. 2

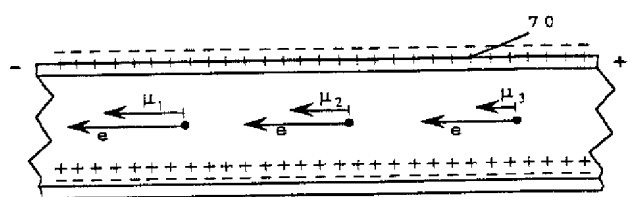


Fig. 3

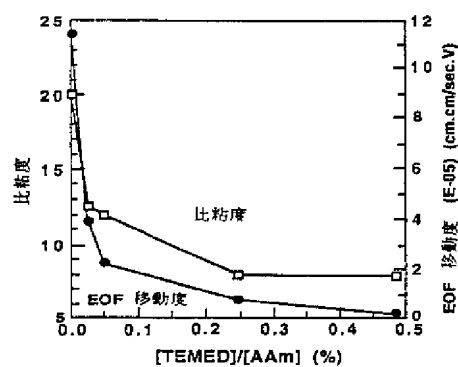


Fig. 4

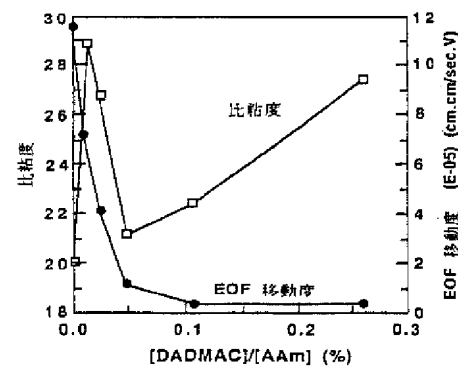


Fig. 5

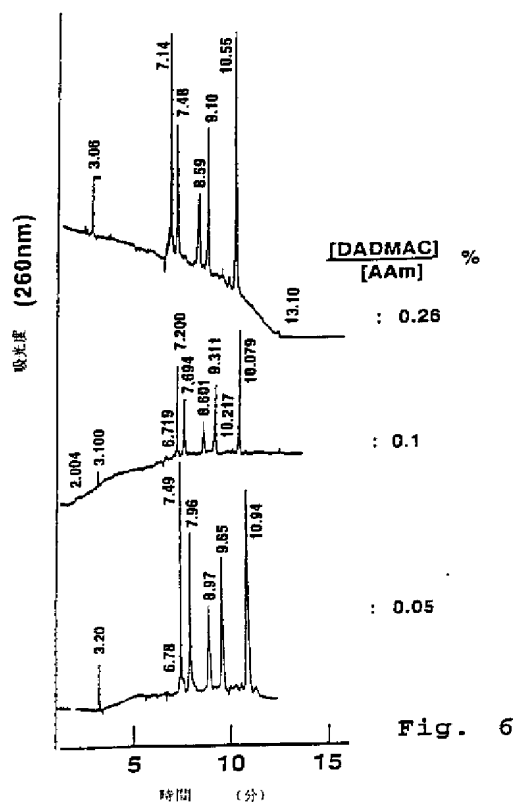


Fig. 6

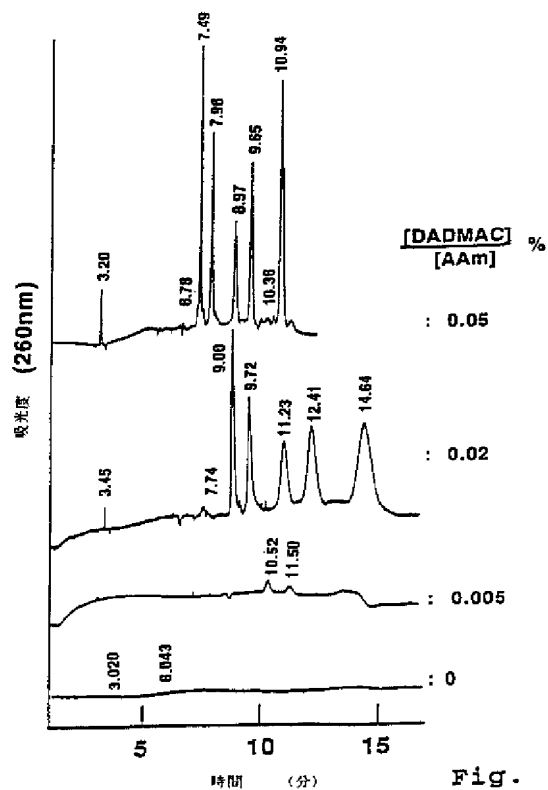
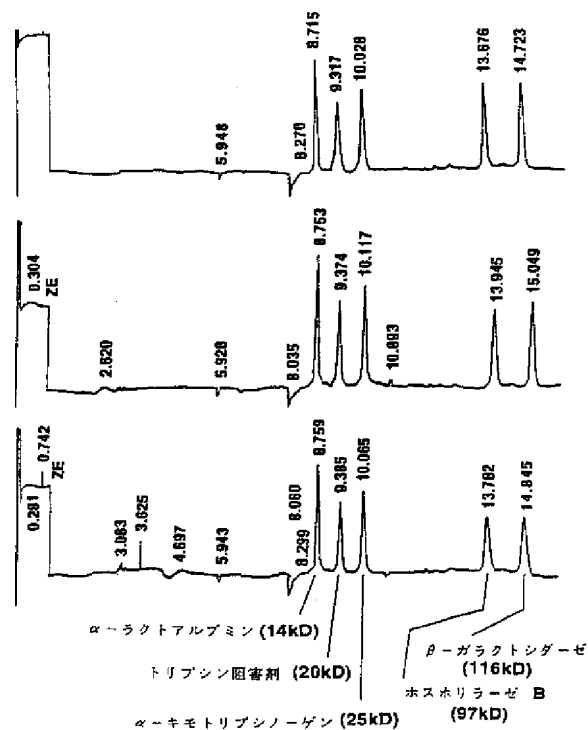
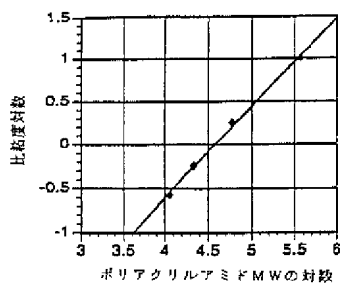
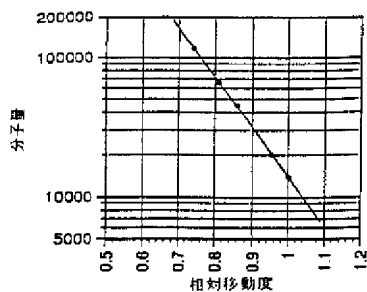
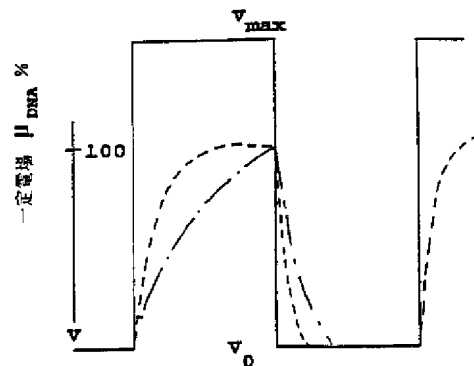
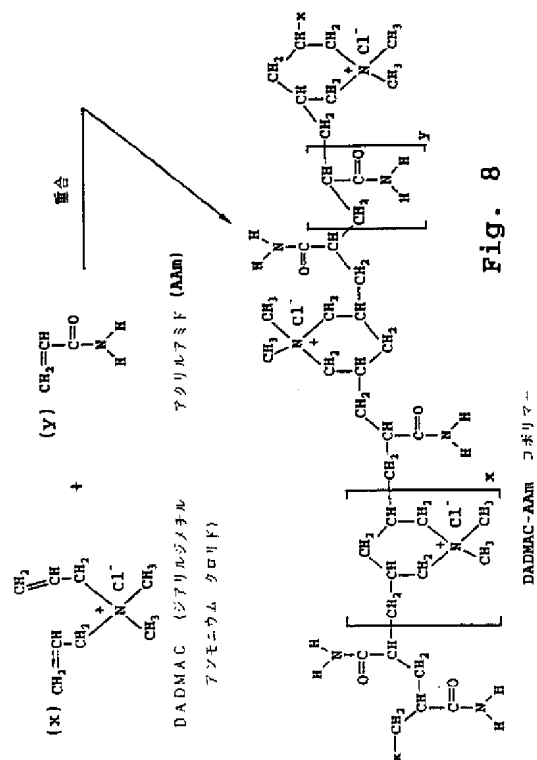


Fig. 7



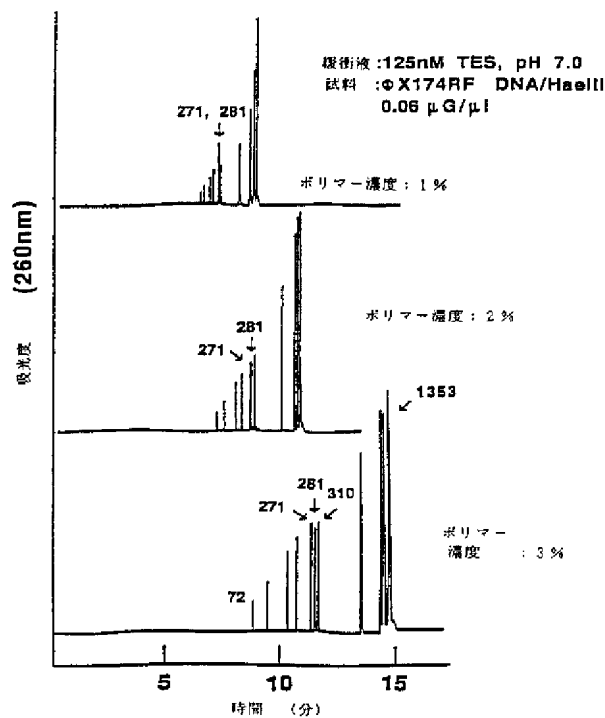


Fig. 12

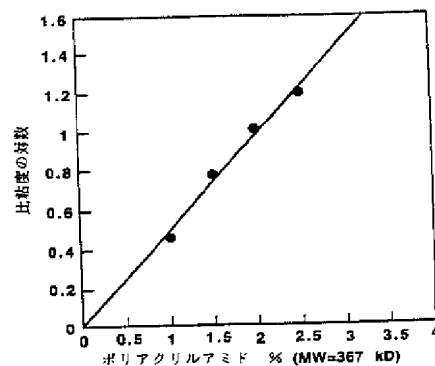


Fig. 14

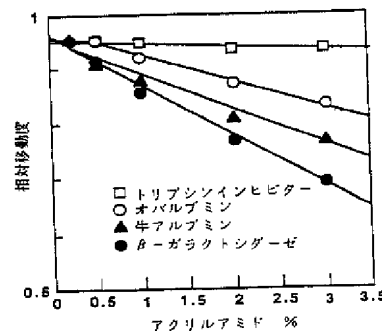


Fig. 15

国際調査報告		International application No. PCT/JP91/04078
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (IPC) : G01N 27/26, 27/447 US CL. : 204/180.1, 204/182.8 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base searched during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Journal of Chromatography, Volume 549, (1991), Alexandra Wdhaln et al., "Capillary zone electrophoresis with a linear, non-cross-linked polyacrylamide gel: separation of proteins according to molecular mass", 446-451, see "procedure" section page 447.	1,11-13,15,16,17-22,25-27,29 and 31
X	Electrophoresis 1991, 12 (1991), Toshio Takagi et al., "Application of schlieren optics to real-time monitoring of protein electrophoresis in crosslinker-free linear polyacrylamide solution", 436-438, see page 437.	1,11-13,15,16,17-22,25-27,29 and 31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
Special categories of cited documents: "A" documents published the subject matter of the invention is not considered to be part of prior art "E" earlier documents published on or after the international filing date "L" documents which are known to the inventor (or to which he is entitled) at the time of filing the international application but which are not known to the public (or to which he is entitled) at the time of filing the international application "P" documents published prior to the international filing date but not known to the inventor (or to which he is entitled) at the time of filing the international application "X" documents published after the international filing date but not known to the inventor (or to which he is entitled) at the time of filing the international application "Y" documents published after the international filing date but not known to the inventor (or to which he is entitled) at the time of filing the international application "Z" documents published after the international filing date but not known to the inventor (or to which he is entitled) at the time of filing the international application		
Date of the actual completion of the international search 28 JUNE 1993		Date of mailing of the international search report 27 JUL 1993
Name and mailing address of the ISA/US Communications Patent and Trademarks Box 107 Washington, D.C. 20541 Pageable No. NOT APPLICABLE		Authorized official JOHN S. STANISIAK Telephone No. (202) 358-0661

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 8 F 220/56	MNC	7242-4 J	
226/02	MNL	7242-4 J	
C 0 8 L 33/24	L J W	7242-4 J	
C 1 2 Q 1/68	Z	9453-4 B	
G 0 1 N 33/68		7055-2 J	
// B 0 1 D 57/02		9344-4 D	
C 1 2 N 15/09			
	9281-4 B		
		C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者	ウェルナー, ウィリアム イー	(72)発明者	ウェンツ, エイチャーマイケル
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州		アメリカ合衆国 カリフォルニア州
	94070 サン カルロス, アパートメント		94061 レッドウッド シティ, カントリ
	1, メレンディ ドライブ 2760		イ クラブ ロード 3733
(72)発明者	ウイクトロウイツ, ジョン イー	(72)発明者	オークス, フランク エル
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州		アメリカ合衆国 カリフォルニア州
	95119 サン ジョーズ, サン アンセル		94521 コンコード, カウリ コート
	モ ウエイ 6416		3981



【公報種別】特許法第 17 条第 1 項及び特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 6 部門第 1 区分

【発行日】平成 12 年 9 月 12 日 (2000. 9. 12)

【公表番号】特表平 7-506432

【公表日】平成 7 年 7 月 13 日 (1995. 7. 13)

【年通号数】

【出願番号】特願平 5-519538

【国際特許分類第 7 版】

G01N 27/447

C07H 21/04

C07K 1/26

C08F 220/56 MNC

226/02 MNL

C08L 33/24 LJW

C12Q 1/68

G01N 33/68

// B01D 57/02

C12N 15/09

【F I】

G01N 27/26 331 Z

C07H 21/04 Z

C07K 1/26

C08F 220/56 MNC

226/02 MNL

C08L 33/24 LJW

C12Q 1/68 Z

G01N 33/68

B01D 57/02

G01N 27/26 301 A

C12N 15/00 A

手続補正書

平成12年4月11日

請求の範囲

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

平成5年特許願第519538号

## 2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94404 フォスターシティ  
リンカーン センター ドライブ 850

名称 アプライド バイオシステムズ インコーポレイテッド

## 3. 代理人

住所 〒510-5015 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー15階

氏名 (7828) 片理士 山本 秀英  
電話 (大阪) 06-6949-3910

## 4. 補正対象書類名

請求の範囲

## 5. 補正対象項目名

請求の範囲

## 6. 補正の内容

請求の範囲を別紙のとおり補正します。

6. 請求項2に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーまたはコポリマーは、ポリビニルピロリジン、ポリビニルアルコール、またはポリビニル酢酸を含有する、キャピラリーチューブまたは導管。

7. 請求項2に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーまたはコポリマーは、キサンタン、デキストラン、寒天、グアー (gum arabic)、または澱粉を含有する、キャピラリーチューブまたは導管。

8. 請求項2に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーまたはコポリマーは、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、またはヒドロキシプロピルメチルセルロースを含有する、キャピラリーチューブまたは導管。

9. 請求項2に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーまたはコポリマーは、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、またはポリエチレンジグリコールモノメタクリレートを含有する、キャピラリーチューブまたは導管。

10. 請求項1に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーまたはコポリマー溶液は、水溶性ポリマーを含む、キャピラリーチューブまたは導管。

11. 請求項1に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーおよびコポリマーは、第1級アミン類、第2級アミン類、第4級アミン類、カルボン酸類、スルホン酸類、リン酸類、硫酸類、およびホスホン酸類から選ばれる少なくとも一つの荷電した基を含む、キャピラリーチューブまたは導管。

1. その内臓表面に荷電した化学基を有するキャピラリーチューブまたは導管であって、該チューブまたは導管は、(a) 20と5,000キログラムとの間の分子量、および(b) 全ポリマーサブユニットに対し荷電したモノマーサブユニットのモルパーセントによって規定されるときに0.01〜1.0%の荷電率パーセントを有する少なくとも一つのポリマーまたはコポリマー種を含有する水溶性水性ポリマーまたはコポリマー溶液、0.5〜8.0重量% (w/w) を含有する電解質溶液を含有し、ここで、該荷電したモノマーサブユニットは陰電荷と逆の電位を有する、キャピラリーチューブまたは導管。

2. 請求項1に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーまたはコポリマーは、ポリアクリルアミド、ポリオキシド、ポリエーテル、ビニルポリマー、セルロースポリマー、アクリルポリマー、天然ゴム、または多環族を含有し、そして該ポリマーまたはコポリマーが特定の電荷パーセントを含有する、キャピラリーチューブまたは導管。

3. 請求項1に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーまたはコポリマーは、ポリアクリルアミド、ポリ(メタクリルアミド)、ポリ(N-メチルアクリルアミド)、またはポリ(N, N-ジメチルアクリルアミド)を含む、キャピラリーチューブまたは導管。

4. 請求項2に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーまたはコポリマーは、ポリオキシド、またはポリプロピレノキシドを含む、キャピラリーチューブまたは導管。

5. 請求項2に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーまたはコポリマーは、ポリビニルメチルエーテルを含む、キャピラリーチューブまたは導管。

12. 請求項1に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーおよびコポリマー分子は、ジアリルジメチルアンモニウム塩、テトラメチルエチレンジアミド、3-(メタクリロアミノ)プロピル-1-トリメチルアンモニウム塩、2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)塩、および2-メチルアクリルオキシエチル(トリメチルアンモニウム)塩に由来する正に荷電した基を含む、キャピラリーチューブまたは導管。

13. 請求項1に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーは、アクリルアミドと塩化ジアリルジメチルアンモニウム(DADMAC)とのコポリマーであり、かつ約2.00〜6.00キログラムの間の分子量を有し、そして該ポリマー分子は、アクリルアミドサブユニット一つあたり0.02〜0.4%のN, N-ジメチルピロリジンを含む、キャピラリーチューブまたは導管。

14. 請求項1に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーは、アクリルアミドとテトラメチルエチレンジアミン(TEMED)とのコポリマーであり、かつ約1.00〜5.00キログラムの間の分子量を有し、そして該ポリマー分子は、アクリルアミドサブユニット一つあたり0.05〜0.5%のテトラメチルエチレンジアミンを含む、キャピラリーチューブまたは導管。

15. 請求項1に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーは、N, N-ジメチルアクリルアミドとテトラメチルエチレンジアミン(TEMED)とのコポリマーであり、かつ約2.00〜8.00キログラムの間の分子量を有し、そして該ポリマー分子は、N, N-ジメチルアクリルアミドサブユニット一つあたり0.03〜0.8%のテトラメチルエチレンジアミンを含む、キャピラリーチューブまたは導管。

16. 請求項1に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記ポリマーは、アクリルアミドおよび3-(メタクリロイルアミノ)プロピ

ル)トリメチルアンモニウムクロリドとのコポリマーであり、かつ約200～600キログラムの間の分子量を有し、そして該ポリマー分は、アクリルアミドサブユニットつあたり0.01～0.2%のN-[(プロピル)トリメチルアンモニウムクロリド]メタクリルアミドを含む、キャピラリーチューブまたは導管。

17. 請求項1に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、該電荷と逆の電荷を含有するポリマー分子の濃度が、非共有結合的に該誘電体を被覆し、かつ $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{秒} \cdot \text{V}$ 、未満の漸減温度を生じるために十分である、キャピラリーチューブまたは導管。

18. 請求項1～17のいずれか1項に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記溶液がドデシル硫酸ナトリウムを含む、キャピラリーチューブまたは導管。

19. 請求項1～17のいずれか1項に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、ここで、前記溶液は尿素またはホルムアミドを含む、キャピラリーチューブまたは導管。

20. 請求項1～19のいずれか1項に記載のキャピラリーチューブまたは導管であって、200μm以下の内径を有する、キャピラリーチューブまたは導管。

21. 請求項1～20のいずれか1項に記載のキャピラリーチューブまたは導管を電気泳動のために調製する方法であって、該方法は、本體表面に付着した化学基を有するキャピラリーチューブまたは導管に(a)20と5、000キログラムの間の分子量、および(b)各ポリマーサブユニットに対し付着したモノマーサブユニットのモルパーセントによって測定されるときに0.01～1.0%の間の電荷パーセントを有する少なくとも一つのポリマーまたはコポリマー種を含有する非炭酸塩水性ポリマーまたはコポリマー溶液を、0.5～2.0重量%

(w/w)を含有する電解質溶液を流通する工程であって、ここで該荷電したモノマーサブユニットは、選択されたpHで該電荷と逆の電荷を有する工程、を含む、方法。

22. 試料中の生体分子を抽出する方法であって、該方法は、以下の工程：

i) 請求項1～20のいずれか1項に記載のキャピラリーチューブまたは導管を2つの箱壁とともに調製する工程であって、前記荷電したモノマーサブユニットは、選択した電気泳動pHにおいて、前記電荷と逆の電荷を有する、工程；

ii) 該キャピラリーチューブまたは導管の該端壁を電解質溶液を含有するアノードとカソードの貯蔵器に遷す、工程；

iii) 分離される該生体分子を含有する試料を該キャピラリーチューブまたは導管の一端に導入する、工程；

iv) 該試料中の該生体分子を分離するために有効な電圧を用いて該貯蔵器を横切って電界を印加する、工程；および

v) 該キャピラリーチューブまたは導管において分離された生体分子の存在を抽出する、工程、を含む、方法。

23. 前記生体分子がタンパク質、ポリペプチド、またはバプテドである、請求項22に記載の方法。

24. 前記貯蔵器中の溶液がドデシル硫酸ナトリウムを含む、請求項22または23に記載の方法。

25. 前記生体分子が核酸フラグメントである、請求項22に記載の方法。

26. 前記貯蔵器中の溶液が尿素またはホルムアミドを含む、請求項22～25のいずれか1項に記載の方法。

27. 前記フラグメントが2本鎖核酸であり、該移動度が該フラグメントに内位添加剤を無効して調製される、請求項25に記載の方法。

28. DNA試料の制限消化分析を行う際に使用するため、さらに1またはそれ以上の選択された制限エンドヌクレアーゼで該試料を消化する工程を含む、請求項25に記載の方法。

29. 前記核酸フラグメントが、DNA配列決定反応の生成物であり、そして該DNA配列決定反応が、蛍光標識で標識を付けた核酸を含む、請求項26に記載の方法。

30. 前記生体分子が、1本鎖DNAであり、そして該生体分子の相対移動度が、該生体分子間の配座多形性に依存する、請求項25に記載の方法。

31. 前記生体分子がポリメラーゼ鎖反応の増幅生成物であるDNA分子である、請求項25に記載の方法。

32. 前記生体分子が、核酸-タンパク質複合体である、請求項25に記載の方法。

33. 前記生体分子が、線状、分岐状、天然、または化学的改変オリゴ核酸である、請求項25に記載の方法。

T S2/67/ALL

2/67/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2006 The Thomson Corporation. All rts. reserv.

0006558189 - Drawing available

WPI ACC NO: 1993-368969/

**Capillary electrophoresis of bio-molecules - using hydrophilic polymer;  
separates proteins, nucleic acids, oligosaccharide(s), etc.**

Patent Assignee: APPLIED BIOSYSTEMS INC (BIOW); PERKIN-ELMER CORP (PEKE)

Inventor: DEMOREST D M; OAKS F L; WENZ H; WERNER W E; WIKTOROWICZ J E

**Patent Family** (8 patents, 17 countries)

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update
WO 1993022665	A1	19931111	WO 1993US4078	A	19930430	199346 B
US 5264101	A	19931123	US 1989432061	A	19891106	199348 E
			US 1991682582	A	19910408	
			US 1992877956	A	19920501	
EP 638168	A1	19950215	EP 1993910939	A	19930430	199511 E
			WO 1993US4078	A	19930430	
JP 7506432	W	19950713	JP 1993519538	A	19930430	199536 E
			WO 1993US4078	A	19930430	
EP 638168	A4	19950719	DE 69310865	A	19930428	199617 E
EP 638168	B1	19980708	EP 1993910939	A	19930430	199831 E
			WO 1993US4078	A	19930430	
DE 69319596	E	19980813	DE 69319596	A	19930430	199838 E
			EP 1993910939	A	19930430	
			WO 1993US4078	A	19930430	
JP 3176373	B2	20010618	JP 1993519538	A	19930430	200136 E
			WO 1993US4078	A	19930430	

Priority Applications (no., kind, date): US 1991682582 A 19910408; US 1989432061 A 19891106; US 1992877956 A 19920501

**Patent Details**

Number	Kind	Lan	Pg	Dwg	Filing Notes
WO 1993022665	A1	EN	75	15	
National Designated States, Original: JP US					
Regional Designated States, Original: AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE					
US 5264101	A	EN	26	0	Continuation of application US 1989432061
					C-I-P of application US 1991682582
					Continuation of patent US 5015350
					C-I-P of patent US 5181999
EP 638168	A1	EN			PCT Application WO 1993US4078
					Based on OPI patent WO 1993022665
Regional Designated States, Original: AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI LU MC NL PT SE					
JP 7506432	W	JA	16	0	PCT Application WO 1993US4078
					Based on OPI patent WO 1993022665
EP 638168	A4	EN			
EP 638168	B1	EN			PCT Application WO 1993US4078
					Based on OPI patent WO 1993022665
Regional Designated States, Original: AT BE CH DE DK FR GB IE IT LI LU MC NL PT SE					
DE 69319596	E	DE			Application EP 1993910939
					PCT Application WO 1993US4078
					Based on OPI patent EP 638168

JP 3176373

B2 JA 25

Based on OPI patent WO 1993022665  
PCT Application WO 1993US4078  
Previously issued patent JP 07506432

Based on OPI patent WO 1993022665

**Alerting Abstract WO A1**

A new method for separating bimols. in a sample comprises (i) preparing a capillary tube with two ends, which has charged chemical gps. on its inner wall surface and is filled with an electrolyte (EC) soln. contg. 0.05-30% wt./wt. of a non-crosslinked, hydrophilic polymer or copolymer soln. contg. at least 1 (co)polymer having: (a) a mol.wt. of 20-5000 kD; and (b) a percent charge of 0.01-1% as measured by the molar percent of charged monomer subunits (CMS) to total polymer subunits, where the CMS have a charge opposite to the wall charge at a selected electrophoresis pH; (ii) immersing the ends in anodic and cathodic reservoirs contg. EC soln.; (iii) introducing a sample contg. the bimols. into one end; and (iv) applying an electric field across the reservoirs with a polarity that fractionates the bimols.

USE/ADVANTAGE - The method enables the sepn. of bimols. such as proteins, nucleic acids and oligosaccharides by capillary electrophoresis.

**Equivalent Alerting Abstract US A**

Biomolecules in a sample are separated (A) using a capillary tube having (a) charged chemical gps. on its inner wall and (b) is filled with an electrolyte soln. contg. 0.05-30% non-crosslinked hydrophilic (co)polymer of mol.wt. 20-5,000 kilodalton and a % charge of 0.01-10% as mol.% charged subunits; total subunits in the (co)polymer, with the charged subunits having a charge opposite to the wall charge at a selected electrophoresis pH; (B) immersing the ends of the tube in cathodic and anodic reservoirs contg. electrolyte soln.; (C) introducing the sample into 1 end of the tube and (D) applying an electrical field across the reservoirs with a polarity effective to fractionate the biomolecules.

The (co)polymer is pref. a polyacrylamide, polyoxide, polyether, vinyl polymer, acrylic polymer, cellulose polymer, natural gum or polysaccharide all modified to a certain % charge.

USE - For restriction digest analysis of a DNA sample. For the separation of (un)branched, native or chemcially modified oligosaccharides.

**Class Codes**

International Classification (Main): G01N-027/26, G01N-027/447

(Additional/Secondary): B01D-057/02, C07H-021/04, C07K-001/26, C08F-220/56, C08F-226/02, C08L-033/24, C12N-015/09, C12Q-001/68, G01N-033/68

DWPI Class: A89; B04; J04; S03